

Aus der II. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhaus
haus Berlin - Neukölln

(Dirigierende Ärztin: Professor Dr. med. IRENE BOLL)

DIE EINWIRKUNG VON ADRIAMYCIN
AUF KNOCHENMARK VON AKUTEN UND
CHRONISCHEN LEUKÄMIEN IN VITRO

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnarzt Harald - Henry Sorber
aus Wolfsburg

1976

Aus der II. Inneren Abteilung des Städtischen Kranken-
hauses Berlin - Neukölln

(Dirigierende Ärztin: Professor Dr. med. IRENE BOLL)

DIE EINWIRKUNG VON ADRIAMYCIN
AUF KNOCHENMARK VON AKUTEN UND
CHRONISCHEN LEUKÄMIEN IN VITRO

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnarzt Harald - Henry Sorber
aus Wolfsburg

Referent: Frau Professor Dr. Irene B o l l

Korreferent: Herr Professor Dr. med. W.D. Germer

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 26. 4. 1976

Meinen Eltern gewidmet



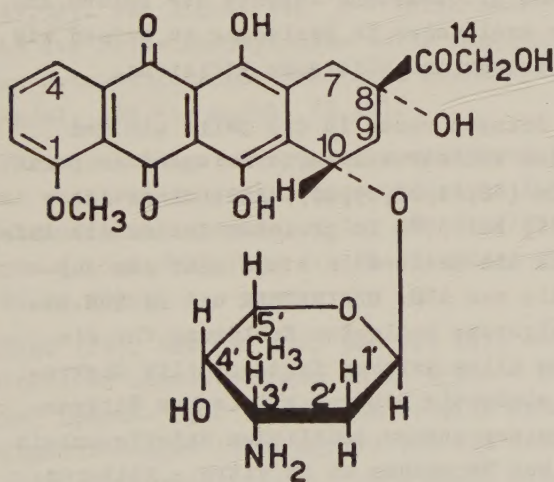


INHALTSVERZEICHNIS

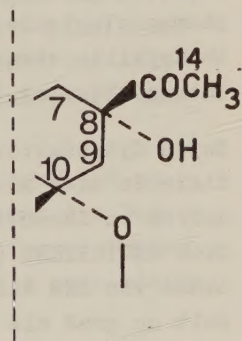
	Seite
EINFÜHRUNG	3
FRAGESTELLUNG	20
METHODE	21
ERGEBNISSE	25
DISKUSSION	68
ZUSAMMENFASSUNG	75
LITERATURVERZEICHNIS	76

EINFÜHRUNG

ADRIAMYCIN^{R +}) wurde 1967 erstmals von ARCAMONE, DI MARCO et al. aus Kulturen von *Streptomyces peuceticus* var. *caesi*us isoliert (14,15). Neben der Isolierung besteht die Möglichkeit der chemischen Synthese aus dem - vier Jahre zuvor von GREIN isolierten - eng verwandten DAUNOMYCIN^{R +}). Beide Cytostatika gehören zur Gruppe der Anthrazykline und unterscheiden sich in ihrer chemischen Struktur nur geringfügig: beim ADRIAMYCIN ist in C₁₄ - Stellung ein H - Atom durch eine Hydroxylgruppe ersetzt (1).



ADRIAMYCIN



DAUNOMYCIN

(Formel-
ausschnitt)

⁺) im folgenden auch ADR bzw. DNR abgekürzt

In sauren Lösungen zerfällt ADRIAMYCIN in das wasserunlösliche rot pigmentierte Aglykon Adriamycinone und den wasserlöslichen basischen Aminosucker Daunosamin (1,14,15, 19). ADR kommt als pulverförmiges Hydrochlorid in 10 bzw. 20 mg enthaltenden Ampullen in den Handel (6,34). Dank seiner polaren Eigenschaften ist es in destilliertem Wasser, physiologischer Salzlösung und 5%-iger Glukoselösung wie auch in Methanol und wässrigen Alkoholen löslich (1,14,19,34).

Die Analogien zwischen DNR und ADR sind zahlreich, Unterschiede folglich fast ausschließlich quantitativer, kaum einmal qualitativer Natur. Es erscheint daher sinnvoll, pharmakologische und biochemische Aspekte der beiden Anthrazykline ebenso zueinander in Beziehung zu setzen wie therapeutisches Spektrum und klinische Effizienz.

Beide Cytostatica dringen rasch in die Zelle ein und fixieren sich an den Kernstrukturen, vorwiegend am perinukleären Chromatin (18,21,22,29,40). Allerdings ist nach MERIWETHER (31) bei 37°C in gleichen Zeiten die Aufnahme von DNR durch die Zelle doch etwas mehr als doppelt so groß wie die von ADR. MERIWETHER und BACHUR sehen darin eine wenigstens teilweise Erklärung für die übereinstimmend von allen Autoren festgestellte Diskrepanz zwischen der eindeutig höheren klinischen Wirksamkeit des ADR und seiner ebenso deutlichen Unterlegenheit gegenüber dem DNR bei Versuchen an in vitro - Kulturen.

Die antimitotische und damit cytocide Wirkung des ADR beruht wie die der Schwestersubstanz auf einer - von Dosis und Einwirkungsdauer abhängigen - Synthesehemmung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und der Ribonukleinsäure (RNA) (2,6,18,21,29,31,40,42,49,52). Der Mechanismus der DNA - Blockade ist für beide Chemotherapeutika gleich; sie bilden mit der DNA Komplexe, indem sie sich zwischen die homologen Basenpaare der WATSON-CRICK - Spirale einschalten, damit eine Trennung der DNA - Einzelstränge

verhindern und so schon den Anfangsschritt der Polymerisationsreaktion unmöglich machen (6,18,21,52). Die Hemmung der RNA - Synthese erfolgt nach BLUM (6) über Fehlsteuerungen im Syntheschema, kombiniert mit sterischer Behinderung.

Diese Erkenntnisse über die Wirkungsweise der beiden Mitosegifte dürfen durch Beobachtungen zahlreicher Autoren an in vitro - Kulturen meist leukämischer Zellen als gesichert gelten. Die in diesen Kulturen festgestellte dosis- und zeitabhängige Verkürzung der Einbauraten radioaktiv markierter Vorstufen (^3H - Thymidin, ^3H - Uridin) in die DNA bzw. RNA ist jedoch unter DNR - Zusatz nahezu doppelt so groß wie unter Verwendung äquimolarer Mengen ADR (2,31, 40,49,52). Der Einbau von ^3H - Valin oder ^3H - Leucin und damit die Proteinbiosynthese wurde dagegen erst bei sehr hohen Cytostaticakonzentrationen überhaupt inhibiert (DNR $>5\mu\text{g/ml}$, ADR $>10\mu\text{g/ml}$) (2,49).

In PHA - stimulierten Lymphozytenkulturen führte ADR zu einer wiederum konzentrationsabhängigen Abnahme der Blastentransformationsrate; unter dem Einfluß höherer Dosierungen ($>3\mu\text{g/ml}$) fand die Blastogenese nicht mehr statt (3,22,29,42).

MASSIMO (29), STACHER (52) und VIG (47) sahen bei vergleichbaren Untersuchungen an in vitro - Kulturen menschlicher Lympho- bzw. Leukozyten bereits unter dem Einfluß geringster Mengen ($0,02\mu\text{g/ml}$) von ADR eine signifikante Abnahme der Mitoseindices; Dosierungen über $0,5\mu\text{g/ml}$ führten nach MASSIMO (29) zum totalen mitotischen Block.⁺) Die vorerwähnten minimalen Konzentrationen des Cytostatikums verursachten Deformationen der Zellmorphologie; neben polyploiden Riesenzellen mit stark verringertem Cytoplasmaanteil wurden häufig auch nackte Zellkerne beobachtet (29,42), nach ADR - Zusätzen über $0,5\mu\text{g/ml}$ traten vermehrt devitale Zellen auf. Die Skala der Zerstörungen

⁺) Kulturmedien und Versuchsbedingungen unterschieden sich allerdings grundsätzlich von den hier verwendeten

reichte dabei von der Agglutination des Kernchromatins bis zur vollständigen Lysis sämtlicher Zellstrukturen (29,42). Den größten Anteil an den Chromosomenaberrationen hatten nach VIG (47) Chromosomenfragmente und der Austausch von Chromatiden; nicht selten entstanden aber auch aus Verbindungen von Chromatidfragmenten mit unzerstörten Chromatiden oder Chromosomen ovale, ringförmige und polyradiale Figuren (29).

Beide Cytostatica, ADR wie DNR, werden - wie insbesondere Untersuchungen von ARENA (2) und DI MARCO (18) an Mäusen mit Sarkom 180 gezeigt haben - nach intravenöser Applikation innerhalb weniger Minuten unmittelbar aus dem Blut in die Gewebe aufgenommen und erreichen in den ersten Stunden vor allem in Leber und Niere, aber auch in Milz, Intestinum, Lunge und Herz beachtliche Konzentrationen (4,6,21). Während es im Knochenmark und besonders in der Milz auch über einen Zeitraum von 24 Stunden hinaus zu eindeutig kumulativen Effekten kommt, sind im selben Zeitraum die extrem hohen Anfangskonzentrationen in Leber und Niere weitgehend abgebaut (2,18). Blutspiegel und Konzentration im Tumor sind für beide Chemotherapeutika über den gesamten Beobachtungszeitraum von 72 Stunden gleichbleibend niedrig (2,18); im Gehirn waren die festgestellten Mengen jedoch so geringfügig, daß praktisch von einer Undurchlässigkeit der Blut/Hirn-Schranke für DNR und ADR gesprochen werden kann (18). Klinische Mißerfolge bei der Therapie von Hirntumoren mit den Anthrazyklinen stützen diese Feststellung (4,52).

Zwischen den Konzentrationen der beiden Cytostatica in den Organgeweben und im Blut besteht nach GHIONE (21) eine feste Wechselbeziehung: der raschen Aufnahme dieser Substanzen aus dem Blut in die Organe folgt über mehrere Tage eine kontinuierliche Rückgabe in das Blut; diese Speicherfunktion vor allem nukleinsäurereicher Gewebe führt zu dem lange anhaltenden gleichmäßig niedrigen Blutspiegel.

Die Ausscheidung von DNR wie ADR erfolgt in erster Linie über die Leber; die Exkretion über die Niere spielt dagegen kaum eine Rolle (2,4,6). Da jedoch DNR nach Tierversuchen an Ratten und Mäusen annähernd doppelt so schnell aus dem Körper eliminiert wird wie ADR, muß gerade die kontinuierliche Dosierung von ADRIAMYCIN über einen längeren Zeitraum zwangsläufig zu gefährlichen kumulativen Toxizitätssteigerungen führen (2,18). Auf diesem markanten pharmakokinetischen Unterschied der beiden Anthrazykline, der nach Applikation gleicher Dosen mit ADR zu deutlich länger anhaltenden und höheren Konzentrationen im Blut und in den Organen führt, basiert offenbar auch die klare therapeutische Überlegenheit des ADR gegenüber dem DNR.

Wie Tierexperimente von ARENA (2) und SANDBERG (38) zeigten, müssen ADR wie DNR in vivo intravenös, intraperitoneal oder subcutan verabfolgt werden; per os bleiben sie unwirksam, da im gastrointestinalen Trakt eine Resorption nicht erfolgt. In der Therapie maligner Neoplasien an Tieren erwies sich ADR als die grundsätzlich effektivere Substanz: so steigerte etwa beim Ehrlich - Ascites - Tumor der Mäuse DNR die durchschnittliche Überlebensrate gegenüber unbehandelten Kontrolltieren um fast das Doppelte, ADR dagegen um annähernd das Dreifache; beim Sarkom 180, ebenfalls an Mäusen, war die durch ADR verursachte Hemmung des Tumorstwachstums sogar annähernd doppelt so groß wie nach gleichen Mengen DNR (2,18,19). Weitere Experimente von DI MARCO (18,19) und HOSHINO (26) wiesen ADR als das klar wirksamere Chemotherapeutikum auch beim Oberling - Guérin - Guérin - Myelom und beim Yoshida - Sarkom der Ratte aus; in der Behandlung des Lymphosarkoms und des Mammarkarzinoms an C3Hf - Mäusen, einem relativ therapieresistenten Tumor, führte ADR ebenfalls zu einem deutlich stärkeren Ansteigen der mittleren Überlebensraten als DNR.

Noch eindrucksvoller fielen die Remissionsraten in der Therapie experimenteller Leukämien der Mäuse aus. Die erziel-

ten Ergebnisse und damit der Nachweis höherer Effektivität für ADR blieben dabei auch unter Verwendung einer Vielzahl von verschiedenen Behandlungsschemata und entsprechend variablen Dosierungen stets reproduzierbar. Bei der L 1210 - Leukämie der Mäuse sah SANDBERG (38) im Vergleich mit unbehandelten Kontrolltieren nach DNR - Behandlung Steigerungen der mittleren Überlebensraten um 54 % gegenüber 151 % nach Applikation gleicher Dosen ADR. Ähnliche Werte berichten auch GOLDIN (24) und Hoshino (26) mit einer Verbesserung der durchschnittlichen Überlebensrate um maximal 56 bzw. 88 % durch DNR, jedoch 121 bzw. 153 % durch ADR. Geringere, aber immer noch eindeutige Vorteile besaß ADR auch in der Behandlung der P 388 - Leukämie der Mäuse. In vergleichenden Untersuchungen GOLDINS (24) mit den vier Anthrazyklinen ADRIAMYCIN, DAUNOMYCIN, RUBIDAZONE und CARMINOMYCIN erwies sich ADR gegenüber diesen beiden Leukämien als das potenteste Cytostaticum.

An experimentell herangezuchteten DNR - resistenten Untergruppen des Yoshida - Sarkoms der Ratte und der L 1210 - Leukämie der Mäuse wies HOSHINO (26) Kreuzresistenz zu ADR nach; Untersuchungen von WANG (49) an DNR- bzw. ADR - resistenten Zellen in Kultur sowie Lebendbeobachtungen an Mäusen mit resistenten Formen der L 1210 - Leukämie führten zum gleichen Ergebnis. Klinische Erfahrungen von BONADONNA (16), STACHER (43) und TAN (44) scheinen die Kreuzresistenz der beiden Anthrazykline auch in der Humantherapie zu bestätigen.

Allgemeine Orientierungsdaten zur Toxizität von ADRIAMYCIN wurden 1970 von BERTAZZOLI (5) vorgelegt. Die akute Toxizität wurde beurteilt an Hand der Mortalitätsraten von jeweils zehn gesunden Albinomäusen 30 Tage nach einer i.v. Einzelinjektion des Cytostaticums in steigender Konzentration. Die für 50 % der Versuchstiere tödliche Dosis (LD_{50}) lag bei 20,8 mg/kg; die schon früher von DI MARCO (19) ermittelte LD_{50} für DNR betrug 26 mg/kg. In Versuchsreihen

zur chronischen Intoxikation, ebenfalls an gesunden Albinomäusen mit täglichen s.c. Injektionen verschiedener Dosen ADR über einen Zeitraum von 8 Tagen, traten 15 Tage nach Behandlungsende signifikante Mortalitätsraten erst ab Konzentrationen von 6,67 mg/kg/die auf (18,19). Der therapeutische Index schließlich, der sich als Quotient aus der maximal verträglichen Dosis (LD_{10}) und der geringsten effektiven Konzentration darstellt, war für ADR mit 1,21 weitaus günstiger als für DNR mit nur 0,67 (18,19).

Da bis heute keine cytostatisch wirkende Substanz bekannt ist, die selektiv nur den Tumor treffen würde, muß auch beim ADRIAMYCIN grundsätzlich mit Schädigungen gesunder Zellen und Zellsysteme gerechnet werden, die sich klinisch als "Nebenwirkungen" manifestieren. Die toxischen Nebenwirkungen des ADR blieben aber im Tierversuch insgesamt hinter denen von DNR zurück; insbesondere war die Knochenmarkdepression beim Kaninchen nach ADR bedeutend geringer (5, 14,15). Gleichfalls weniger gravierend als unter DNR - Therapie, aber dennoch nicht unwesentlich war die durch ADRIAMYCIN hervorgerufene Cardiotoxizität und Immunsuppression. Wie bei DNR geht die Cardiotoxizität in erster Linie nicht auf das Cytostaticum selbst, sondern seinen Metaboliten, das Aglykon Adriamycinone zurück (2,6, 21). ARENA (2) beobachtete bei Versuchen am Hund eine deutlich negativ inotrope Wirkung des ADRIAMYCINS (Dosierung 1,5 mg/kg i.v.); entsprechend waren Herzminutenvolumen und Coronardurchfluß stark vermindert. Unter Strophantintherapie erfolgte allerdings rasch eine "restitutio ad integrum". Waren die Versuchstiere - Ratten, Kaninchen oder Hunde - dagegen mit Strophantin vorbehandelt, so wurden negative Auswirkungen des ADR auf die Herzaktion überhaupt vermieden. Dieser Antagonismus Strophantin/ADR kommt dadurch zustande, daß Strophantin die Bindungsfähigkeit der Myocardzellen für ADR bedeutend vermindert. Die antineoplastische Wirkung des ADRIAMYCINS wird aber durch die flankierende

Strophantinanplikation in keiner Weise beeinträchtigt (2).

Der eindeutige Nachweis einer Schädigung immunkompetenter Zellen durch DNR und ADR ist einmal durch die bereits früher erwähnte Hemmung der blastischen Transformation wie auch der DNS - und RNS - Synthese in PHA - stimulierten Lymphozytenkulturen erbracht worden (3,22,27,29,42). Zum anderen haben Tierversuche von DI MARCO (18), GHIONE/KARIM (22) und ISETTA (27) mit den beiden Anthrazyklinen an Mäusen, Ratten und Hunden zu signifikanten Gewichtsabnahmen der lymphatischen Gewebe von Thymus, Milz und Lymphknoten, sowie einer deutlichen Reduktion der Lymphozytenzahlen im Blut geführt. Die Synthesehemmung humoraler Antikörper wie Hämolysine und Agglutinine ist dosisabhängig und kumulativ; nach einer Gesamtdosis von 15 mg/kg ADR sah ISETTA (27) an seinen Versuchstieren (Mäuse) eine nahezu vollständige Depression des immunologischen Systems. Der inhibitorische Effekt ist jeweils maximal, wenn das Cytostaticum unmittelbar nach der Antigenstimulierung appliziert wird, da dann die Reaktionen zur Induktion der Antikörperbildung bereits im Ansatz unterbunden werden (22,27). Die experimentelle Staphylococcus aureus - Infektion an 12 Albino - Ratten wurde nach Beobachtungen von GHIONE/KARIM (22) durch die immunsuppressive Wirkung von ADR, mehr noch aber von DNR erheblich verstärkt; unter dem rapiden Anstieg der renalen Bakterienmenge kam es zu einer nachdrücklichen Steigerung der Mortalitätsrate. Untersuchungen von DI MARCO (18) an Mäusen mit experimentell erzeugtem Sarkom vermitteln eine erste summarische Vorstellung von den komplexen Interdependenzen zwischen Tumor, Cytostaticum und immunologischen Abwehrmechanismen. Während bei den erst 16 Tage alten Versuchstieren die über eine Woche fortgesetzte tägliche Applikation annähernd äquitoxischer Mengen ADR (2,25 mg/kg) bzw. DNR (3,25 mg/kg) allenfalls eine kurzzeitige Verzögerung in der Tumorprogression, nicht aber eine Steigerung der mittleren Überlebensrate

bewirkte, führte erstaunlicherweise bei gleichaltrigen Kontrolltieren der Verzicht auf jegliche Therapie regelmäßig in eine vollständige und dauerhafte Remission. Bei über 20 Tage alten Tieren wurde dagegen weitere Tumorprogression nach DNR nur noch selten, nach ADR sogar überhaupt nicht mehr gesehen. Hierfür bietet DI MARCO (18) folgende Erklärung an: Bei den weniger als 20 Tage alten Tieren wird der Aufbau eines funktionsfähigen immunologischen Systems, das normalerweise auf die Antigene dieses experimentell erzeugten Tumors voll anspricht und damit bereits in die Remission überleitet, durch die beiden Anthrazykline von vornherein blockiert. Aus weiteren Experimenten in dieser Richtung ging allerdings klar hervor, daß die toxischen Auswirkungen auf das immunologische System nach ADR stets wesentlich geringer blieben als nach DNR.

Die weitgehende Übereinstimmung der beiden Anthrazykline auf Zellebene in bezug auf ihre antimitotische Wirkungsweise, der im Tierversuch ermittelte höhere therapeutische Index und damit die bei verringerter Toxizität deutlich größere therapeutische Effektivität ließen die klinische Erprobung des ADRIAMYCINS gegenüber den malignen Neoplasien des Menschen von vornherein als sehr aussichtsreich erscheinen. Aus zahlreichen Arbeiten namhafter Autoren zur klinischen Anwendung von ADR wird neben der erwartungsgemäß gegenüber DNR beträchtlich erhöhten therapeutischen Wirksamkeit und der etwas geringeren Toxizität vor allem eine signifikante Erweiterung des Therapiespektrums bei den soliden Tumoren sichtbar (4,6,14,15,16,20,25,28,32,34,41,44,45,46,48). Die therapeutische Bandbreite des ADRIAMYCINS reichte dabei von den malignen Lymphomen einschließlich des Morbus Hodgkin über das Neuroblastom und die Gruppe der Sarkome (Rhabdomyo - S., Leiomyo - S., Neuro - S., Fibro - S., Lipo - S., Angio - S., Synovialzell - S., Ewing - S., Chondro - S., Osteo - S.) bis hin zu den Organkarzinomen (Mamma - Ca., Bronchial - Ca., Ca. der

gl. thyreoidea, des Nasopharynx, der Mundhöhle und des gastrointestinalen Traktes sowie Karzinome von Blase, Prostata, Testes, Uterus und Ovarien). Die mit ADR erzielte Gesamtremissionsrate ⁺) liegt bei den soliden Tumoren nach Zusammenfassung der klinischen Erfahrungsberichte bei etwa 35 %; bemerkenswert ist die hohe therapeutische Effektivität des ADRIAMYCINS vor allem bei den malignen Lymphomen und beim Neuroblastom mit etwa 60 % Remissionen, beim Rhabdomyo - und beim Ewing - Sarkom mit über 50 % Remissionen und beim Mamma -, Bronchial - und Schilddrüsen - Karzinom mit annähernd 40%igen Remissionsraten. Bei der chronisch - myeloischen Leukämie wurden mit ADR außerordentlich hohe Remissionsraten von mehr als 80 % erzielt (14,15,16,32,36); auch die Ergebnisse bei der Therapie der akuten lymphoblastischen Leukämie lagen mit etwa 65 % Remissionen geringfügig über den mit DNR erzielbaren Werten; lediglich bei den akuten myelomonozytären Leukämien ist die Wirksamkeit des ADRIAMYCINS mit etwa 45 % Remissionen etwas geringer als die des DAUNOMYCINS (6,14,15,16,30,32,36,37,39,43,51,52). Allgemein sprachen Kinder und jüngere Erwachsene besser auf ADR an als ältere Menschen und vermochten auch durchweg höhere Dosen zu tolerieren. In die Bewertung der antineoplastischen Potenzen des ADR ist schließlich ein beträchtlicher Anteil an sogenannten "poor risk patients" eingegangen, die sich entweder bereits in einem fortgeschrittenen Stadium ihrer Erkrankung befanden, oder bei denen mehrfach vorangegangene anderweitige Therapieversuche ohne Erfolg geblieben waren; diese Patienten mit langer Vorgeschichte waren auch besonders anfällig für toxische Nebenwirkungen. Unter diesem Aspekt geradezu einer Negativauslese im selbstverständlich vorrangigen Interesse der Patienten sind die mit ADR erzielten guten Ergebnisse in der Behandlung der malignen Neoplasien noch weitaus höher einzuschätzen, als es allein aufgrund des vorliegenden Zahlenmaterials zum Ausdruck kommt. Remissionen traten unter der ADRIAMYCIN - Therapie

⁺) gewertet wurden nur Tumorregressionen bzw. Remissionen über 50 %

fast immer rasch ein, waren aber meist nur von relativ kurzer Dauer; der Mittelwert lag für die akuten Leukämien bei 6...8 Wochen, für die soliden Tumoren bei 3...4 Monaten. Daher ist die klinische Anwendung des ADR heute weitgehend auf die Induktions- und Reinduktionstherapie beschränkt, zur Remissionserhaltung werden überwiegend andere Chemotherapeutika eingesetzt (14,15, 16,28,32,36,43,44,45,46,52).

Die schädlichen Nebenwirkungen des ADRIAMYCINS werden in der Literatur generell als eine Trias aus Alopecie (90 %), Stomatitis (70 %) und Knochenmarkdepression (80 %) beschrieben; der Abfall der peripheren Leukozytenwerte ist dabei umso steiler, je höher die Blutleukozytenzahlungen zuvor ausgefallen sind. Daneben treten in geringerem Umfang gastrointestinale Beschwerden, Fieber und - nach Extravasation am Applikationsort - Phlebitiden und lokale Nekrosen auf. Wenn auch nach ADR des öfteren geringfügige Veränderungen im EKG der Patienten festzustellen waren, so blieben doch - anders als nach DNR - gravierende toxische Schädigungen des Myocards mit nachfolgendem tödlichem Herzversagen die äußerst seltene Ausnahme (4,6,16,28,30,36,39,41,44,45,46). Sorgfältige Überwachung der Herz-/Kreislauffunktionen jedes Patienten, die Vermeidung von Gesamtdosen über 600 mg/m^2 Körperoberfläche innerhalb eines Behandlungszyklus und ggf. die vorbeugende Anwendung antagonistisch wirkender Herzglykoside wie Strophantin sollten die von BONADONNA (16) mit 1,7 % angegebene Letalitätsquote nach therapieinduzierten Myocardschäden weiter verringern können. Höheres Lebensalter und reduzierter Allgemeinzustand, vor allem aber schwere Verlaufsformen der Knochenmarkdepression mit peripherer Panzytopenie und umfassender Suppression des gesamten immunologischen Systems gaben wegen gesteigerter Blutungsneigung und erhöhter Infektionsgefahr mitunter Anlaß zu Dosiskürzungen und The-

rapieunterbrechungen; nur in wenigen Fällen zwangen sie dagegen zum vollständigen Abbruch der Behandlung (4,6, 28,30,34,36,39,41,52). Insgesamt gesehen blieben die toxischen Nebenwirkungen des ADRIAMYCINS etwas hinter denen von DAUNOMYCIN zurück, auch waren sie in ihrem Ausmaß meist besser abzuschätzen; nach Absetzen der ADR-Therapie erwiesen sich die entstandenen Noxen fast ausnahmslos als reversibel.

Sind gewöhnlich Infektionen und Blutungsübel nach Aussetzen des Chemotherapeutikums durchaus zu beherrschen, so können bei Patienten mit nicht rechtzeitig erkannten schweren Leberdysfunktionen - ADR wird ja überwiegend durch die Leber und nur zu einem geringen Teil auch durch die Niere ausgeschieden - schon normale Dosen des Cytostaticums zu einer exzessiven kumulativen Steigerung der Toxizität mit unabsehbaren Folgen führen. So war in einigen Fällen von nahezu vollständiger Knochenmarksaplasie der letale Ausgang nicht mehr aufzuhalten (4,6,15,25). Von BENJAMIN (4), Blum (6) und GOTTLIEB (25) je nach dem Grad der Leberschädigung vorgenommene Dosis-kürzungen um bis zu 75 % reduzierten die Plasmaspiegel des Medikamentes wieder auf durchschnittliche Werte; bei vollkommen normalisierter Toxizität waren dennoch keinerlei Einbußen an therapeutischer Effektivität zu verzeichnen.

Protrahierter Abbau, prolongierte kumulative Plasmaspiegel und daraus resultierende Summationseffekte bei den toxischen Nebenwirkungen nach kontinuierlicher Applikation von ADR haben letztlich auch zu grundsätzlichen Überlegungen in bezug auf ein optimales Dosierungsschema geführt. Während nach der Einführung des ADRIAMYCINS in die klinische Therapie der malignen Neoplasien noch zahlreiche Dosierungsregime zur Diskussion standen, hat sich heute auf der Grundlage der pharmakokinetischen Erkenntnisse (2,4,6,18) das intermittierende Hochdosisschema

als das am wenigsten toxische weitgehend durchgesetzt (hochdosierte i.v. Einzelinjektionen von 60 bis 105 mg/m² Körperoberfläche in Abständen von 3..4 Wochen). Dieses Therapieschema, wie es etwa von BENJAMIN (4), BLUM (6), FREI (20) und GOTTLIEB (25) und in modifizierter Form auch von zahlreichen anderen Autoren praktiziert wird (16,28,37,41,43,45,48,51,52) vermeidet die kumulativen Toxizitätssteigerungen einer konsekutiven Behandlung; der ungestörte allmähliche Abbau der ADR - Konzentrationen in den Geweben und im Blut läßt die schädlichen Nebenwirkungen generell milder ausfallen. Da die Thrombo- und Leukopoese ihren Tiefpunkt etwa am Ende der zweiten Woche nach ADR - Applikation erreicht und sich dann sehr rasch erholt, kommen die Knochenmarkszellen bei einem solchen Therapieplan mit 3..4-wöchigen behandlungsfreien Intervallen regelmäßig in eine echte Erholungsphase; die Gefahr einer irreversiblen Markaplasie ist damit weitgehend ausgeschaltet.

Auf der Grundlage dieser Erfahrungen hat sich NAGEL (33) noch weiter vorgewagt und bei einer Gruppe ausgewählter Patienten mit soliden Tumoren, die einer konventionellen Therapie nicht mehr zugänglich waren, ADRIAMYCIN in extrem hohen Einzeldosen von bis zu 240 mg/m² Körperoberfläche (6 mg/kg Körpergewicht) zur Anwendung gebracht. Allerdings konnten im Rahmen dieser Studie nur infektfreie Patienten mit normalen peripheren Leuko- und Thrombozytenwerten, normaler Leber- und Nierenfunktion und fehlenden Anzeichen für eine vorbestehende Herzkrankheit Berücksichtigung finden. Siebenmal sprachen Tumoren, die mit konventionellen ADR - Dosen nicht mehr zu beeinflussen waren, auf die erheblich höhere Dosierung an; damit erlebte die Hälfte aller im Verlauf dieser Untersuchung behandelten Patienten eine Voll- oder Teilremission. Ohne eine anderweitige Erhaltungstherapie dauerten aber auch diese Remissionen nur wenige Monate. Die Nebenwir-

kungen nahmen, von der Knochenmarkschädigung abgesehen, nur unwesentlich zu. Leukopenie und Thrombopenie waren deutlich gravierender als unter konventionellen Dosen des Cytostaticums und traten früher als üblich, meist schon 6..10 Tage nach ADR - Applikation, auf; die depressive Phase der Knochenmarkzellen dauerte mit etwa 3 Wochen auch etwas länger als sonst. Diese Behandlung mit ADRIAMYCIN in extrem hohen Konzentrationen, bei der aufwendige Einrichtungen zur Prophylaxe und Therapie schwerer Nebenwirkungen unabdingbare Voraussetzung sind, wird wohl auch künftig vorwiegend auf jene Patienten beschränkt bleiben, die gegenüber jeder konventionellen Chemotherapie resistent geworden sind.

Der Schwerpunkt in der Behandlung der malignen Neoplasien hat derzeit begonnen, sich von der Monotherapie in Richtung auf die Kombinationschemotherapie zu verlagern. Für die Einbeziehung in sogenannte "multiple drug protocols" bringt gerade ADR günstigste Voraussetzungen mit: Neben seiner hohen therapeutischen Effektivität und der im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika relativ mäßigen Toxizität zeigt ADRIAMYCIN lediglich gegenüber einem einzigen Cytostaticum, nämlich DAUNOMYCIN, Kreuzresistenz (6,16,26,30,39,43,44,45,49,51). Grundlegendes Motiv für die Erstellung solcher Kombinationstherapieprotokolle sind nicht allein die Bemühungen um eine qualitative und quantitative Verbesserung der Remissionsraten; mindestens ebenso wichtiges Ziel ist vielmehr eine erhebliche Verlängerung der Remissionsdauer bei Verringerung der gerade nach längerer Erhaltungstherapie häufiger auftretenden kumulativen Toxizität. Auf zwei Wegen, einem klinisch-empirischen und einem experimentell-theoretischen, wird derzeit versucht, diese Vorstellungen zu realisieren. Der experimentelle Ansatz geht dabei überwiegend von dem ausgeprägten cytokinetischen Effekt des ADR aus; WHEATLEY (50) hatte schon 1970 festgestellt, daß ADR - wie übrigens auch DNR - in proliferierenden Zellkulturen den Übergang von der

G₂ - Phase zur Mitose blockiert und damit letztlich zu einer Konzentration nahezu der gesamten Zellpopulation in der G₂ - Phase führt. Dieser Befund wird durch neue in vivo (!) - Untersuchungen von GÖHDE (23) an Ehrlich - Ascites - Tumorzellen wie am soliden Ehrlich - Karzinom der Maus, aber auch an menschlichem Knochenmark bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie nachdrücklich bestätigt. Sind die zu inaktivierenden Tumorzellen erst einmal durch eines der beiden Anthrazykline selektiv in dieser - jedenfalls bei allen Säugetieren - sensibelsten Phase ihres Zellzyklus synchronisiert und arretiert, muß sich eine anschließende Therapie mit stark cytocid wirkenden Agenzien wie etwa Röntgenbestrahlung und alkylierenden Cytostatica auf diese Zellen geradezu verheerend auswirken. - Anders ging dagegen OSSWALD (35) vor; seine Kombinationen von ADR mit verschiedenen Nucleosiden wie Guanosinmonophosphat führten im Vergleich zur ADR - Monotherapie beim Sarkom 180 wie beim soliden Ehrlich - Karzinom der Maus nicht nur zu einer erheblichen Potenzierung der therapeutischen Wirkung, sondern darüber hinaus - gemessen an der wesentlich verringerten Abnahme des durchschnittlichen Körpergewichtes der Versuchstiere - zu einer deutlichen Minderung der durch ADR bedingten Nebenwirkungen. Erklärungen dieses Phänomens bewegen sich bislang noch in weitgehend spekulativen Bahnen: Die unphysiologische Dosierung des Nucleosids soll ungleiches Zellwachstum hervorrufen; bei ungehindertem Fortgang der RNA - und Proteinbiosynthese wird eine Blockierung der DNA - Synthese angenommen.

Mehr empirischen Charakter trugen die Tierexperimente von GOLDIN (24) und HOSHINO (26). Überadditive und damit synergistische Effekte gegenüber der L 1210 - und der P 388 - Leukämie der Mäuse erbrachten Zwei- und Mehrdrogenkombinationen von ADRIAMYCIN mit Antimetaboliten wie Methotrexat und Anhydro Ara C, mit alkylierenden Substanzen wie Melphalan und Cyclophosphamid oder mit Agen-

zien unterschiedlicher chemischer Zuordnung wie Dimethyl-Triazeno-Imidazol-Carboxamid, ICRF 159, Vincristin und Mitomycin; extreme Steigerungen der mittleren Überlebensrate der Versuchstiere wurden nach zwei Drogenprotokollen von ADR und Bi-Nitrosurea (349%!) und von ADR und Cytosin-Arabinosid (417 %!) gesehen. Unter allen Kombinationsregimen war die Toxizität kaum additiv; es konnten nahezu die gleichen Mengen der einzelnen Cytostatica gegeben werden, wie jeweils in der Monotherapie.

Klinische Erfahrungsberichte zur Kombinationschemotherapie mit ADRIAMYCIN haben BONADONNA (17), FREI (20), GOTTLIEB (25), SCHWARZENBERG (39) und TAN (46) vorgelegt. Bereits die einfache Kombination von ADR, Vincristin und Prednison führte bei fortgeschrittenem Mamma - Ca zu Gesamtremissionsraten von 60 % (17); mit einer 3 - Medikamentenkombination aus 5 - Fluorouracil, ADR und Cyclophosphamid erreichte GOTTLIEB (25) bei einer Gruppe weitgehend therapierefraktärer Patienten mit diesem Tumor sogar eine 72%ige Remissionsrate, darunter 15 % Vollremissionen. Weitaus komplexere Mehrdrogenprotokolle unter Einschluß von ADRIAMYCIN, Bleomycin, Mechlorethamin, Vinblastin, Dimethyl-Triazeno-Imidazol-Carboxamid, Procarbazine, Cyclophosphamid, VM 26, Vincristin und Prednison erbrachten bei den malignen Lymphomen einschließlich des Morbus Hodgkin - z.T. noch in fortgeschrittenem Erkrankungsstadium - Gesamtremissionsraten zwischen 80 und 95%, darunter zwischen 65 und 80% Vollremissionen (!) (17,25, 39,46). Bei den Weichgewebssarkomen führten Kombinationen von ADR und Cyclophosphamid bzw. ADR und Dimethyl-Triazeno-Imidazol-Carboxamid ebenfalls zu stark verbesserten Remissionsraten von bis zu 71 % (17,25). In der Behandlung von Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie konnte TAN (46) mit einem aufwendigen, kompliziert gestaffelten Behandlungsregime mehr als 85 % Vollremissionen erzielen; bei Kindern mit soliden Tumoren lag die

Gesamtremissionsrate nach einer kombinierten Chemotherapie mit ADR, Vincristin, Methotrexat, Daktinomycin und Cyclophosphamid bei 80 % (46). Auch in der Humantherapie wurden bei Anwendung einer Vielzahl von verschiedenen "multiple drug protocols" allenfalls geringfügige Summationseffekte der toxischen Nebenwirkungen beobachtet; fast immer konnten die einzelnen Komponenten in annähernd der gleichen Konzentration verabfolgt werden wie in der Monotherapie. Die vorläufige Bilanz aus der Anwendung solcher Mehrdrogenprotokolle ist überaus positiv: Neben qualitativ wie quantitativ verbesserten Remissionsraten wurde auch eine erhebliche Verlängerung der durchschnittlichen Remissionsdauer erreicht; kumulative Steigerungen der Toxizität traten auch nach längerer Erhaltungstherapie kaum auf. In der Behandlung der malignen Neoplasien des Menschen scheint damit ein "impetus rerum" eingetreten zu sein; mit der Kombinationschemotherapie verfügt der Kliniker über ein schlagkräftiges und variationsreiches Instrumentarium.

FRAGESTELLUNG

Der Arbeit liegt zugrunde die Frage nach den Auswirkungen von ADRIAMYCIN auf durch akute monozytäre bzw. myelozytäre Leukämien verändertes menschliches Knochenmark. Zahlreiche Autoren haben an Hand von Tierexperimenten, wie auch nach der klinischen Erprobung von ADR die therapeutischen Effekte und Nebenwirkungen dieses Cytostaticums auf leukämisches Knochenmark in vivo beschrieben (siehe Kap. "Einführung"). Da beim lebenden Organismus natürlich auch die Wirkung dieses Chemotherapeutikums nicht isoliert von humoralen und nervalen Faktoren gesehen werden kann, erscheint es von Bedeutung, entsprechende Untersuchungen auch an vollkommen unbeeinflusstem Knochenmark in einem geschlossenen System wie den von BOLL und FUCHS (12) modifizierten Carrell'schen Deckglaskulturen vorzunehmen.

Aus dem unmittelbaren Vergleich solcher in vitro - Kulturen mit einem ADRIAMYCIN - Zusatz von $2.0 \mu\text{g/ml}$ mit parallel dazu angefertigten Kontrollkulturen ohne Zusatz lassen sich Reifung und Regeneration der Knochenmarkzellen direkt beurteilen; Kriterien dieser Bewertung sind Reifungskurven, Mitoseindices, karyologische Kurven und G/E - Indices (Verhältnis von Granulozytopoese zu Erythrozytopoese). Die rel. hohe Konzentration von $2.0 \mu\text{g/ml}$ wurde gewählt, weil sie neben einer deutlichen Hemmung der DNA- und RNA- Synthese auch regelmäßig zu einer erheblichen Verringerung der Blastentransformationsraten in PHA - stimulierten Lymphozytenkulturen führte (2,3,22, 29,31,40,42,49,52). Darüber hinaus hat sich diese Dosis bereits bei - den vorliegenden Untersuchungen entsprechenden Studien von BOLL (11) über die "Auswirkungen von ADRIAMYCIN auf nicht leukämisches Knochenmark in vitro" - ausgezeichnet bewährt.

METHODE

Von fünf an verschiedenen Formen der Leukämie erkrankten Patienten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit insgesamt sechs Sternalpunktate entnommen. Die Kultivierung der Knochenmarkzellen erfolgte nach der durch BOLL und FUCHS (12) modifizierten, ursprünglich von CARRELL angegebenen Deckglasmethode. Unter sorgfältiger Beobachtung der Sterilität wird dabei auf handelsüblichen Deckgläsern eine Mischung aus 50 % autologem Nativplasma, 40 % Eigenserum oder Hank'scher Lösung (physiologische Salzlösung) und 10 % Corrhormon^R 3fach verstärkt, bzw. Hühnerembryonalextrakt zur Coagulation gebracht (11,12). Auf dieses Medium werden Knochenmarkpartikel zusammen mit einem Tropfen Eigenserum aufgebracht und die Kultur mit einem Hohl-schliffobjektträger (Prinzip: hängender Tropfen) und Hartparaffin luftdicht verschlossen, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Anschließend wird im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach jedem Sternalpunktat wurden zunächst ein Originalausstrich (0 Std.) aus dem frisch gewonnenen Knochenmark und nach Bebrütung der Zellen für jeweils 24, 48 und 72 Std. in der beschriebenen Kultur weitere Ausstriche angefertigt:

- a) unter Zusatz von 2.0 µg/ml ADRIAMYCIN, bzw.
- b) ohne Zusatz (Kontrollkulturen)

Nach Lufttrocknung und panoptischer Färbung nach Pappenheim (May - Grünwald - Giemsa) konnte anschließend mittels Differentialzählung unter dem Mikroskop die Auswertung der Präparate vorgenommen werden (8,1,9,11,12,13).

Bei Lupenvergrößerung orientiert man sich über Zellgehalt und Zellverteilung und sucht - meist in der sog. "Fahne" - eine geeignete Stelle mit gleichmäßiger Färbung und möglichst gut ausgebreiteten Zellen für die Be-

trachtung unter Ölimmersionsvergrößerung auf. Das Bild wandert zweckmäßig in Mäanderform; diese Technik garantiert eine repräsentative Zellselektion und hilft Doppelzählungen vermeiden. In jedem Präparat werden mindestens 1000^+ , in der Regel aber 2000 Zellen der Erythro- und der Granulozytopoese sowie Plasmazellen, Reticulumzellen, Lymphozyten und Megakaryozyten einschließlich ihrer Mitosephasen nach morphologischen Charakteristika differenziert.

Die Zellen der roten Reihe werden nach BOLL (13) folgenden Klassen zugeordnet:

- Proerythroblast
- basophiler Erythroblast
- polychromatischer Erythroblast
- oxyphiler Erythroblast
- reifer Erythroblast

Für die Zellen der weißen Reihe erfolgt die Differenzierung in (8.1,13):

- Myeloblast
- Promyelozyt
- neutrophiler Myelozyt
- eosinophiler Myelozyt
- basophiler Myelozyt
- Monoblast
- Promonozyt
- Metamyelozyt (Jugendlicher)
- stabkerniger Granulozyt
- neutrophiler segmentkerniger Granulozyt
- eosinophiler segmentkerniger Granulozyt
- basophiler segmentkerniger Granulozyt
- Monozyt

Zugleich mit der Differenzierung der einzelnen Zellformen erfolgt auch eine Klassifizierung der verschiedenen Mitosephasen. BOLL (7,8.2,9) unterscheidet im fixierten Präparat:

⁺) mit Ausnahme zweier schlecht lesbarer Präparate

- Prophase : Die aufgelockerten Chromosomen sind noch in einem festen Spirem verbunden, die Kernmembran ist aufgelöst, der Nucleolus nicht mehr vorhanden.
- Frühe Metaphase : Die Chromosomen liegen ungeordnet im lockeren Spirem über die ganze Zelle verstreut.
- Späte Metaphase : Nach Verdoppelung ordnen sich die Chromosomen zur Äquatorialplatte bzw. zum Monaster.
- Anaphase : Die geteilten Chromosomen verlagern sich jeweils zur Hälfte zu den entgegengesetzten Polen der Kernspindel und bilden einen Diaster.
- Telophase : Die Chromosomen der beiden Tochterzellen bilden ein lockeres Dispirem, die taillenartige Durchschnürung des Cytoplasmas ist deutlich erkennbar.
- Rekonstruktionsphase : Nebeneinander finden sich - gelegentlich noch durch eine schmale Plasmabrücke verbunden - zwei identische Zellen, deren Chromosomen in einem festen Dispirem liegen; Kernmembranen und Nucleoli sind noch nicht wieder ausgebildet.

Als teilungsfähig gelten in der Erythrozytopoese sämtliche Zellen mit Ausnahme der reifen Erythroblasten.

In der Granulozytopoese werden Mitosefiguren bei Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten und Metamyelozyten sowie Monoblasten und Promonozyten beobachtet.

Die in den Differentialzählungen ermittelten Absolut- bzw. die daraus resultierenden Prozentwerte bilden die

Grundlage der mathematischen Auswertung und graphischen Darstellung; die nachfolgend aufgeführten Parameter dienen schließlich als Kriterien für die Beurteilung von Reifung und Regeneration der untersuchten Zellpopulationen (8.1, 8.2, 9, 11, 13):

In den Reifungskurven spiegelt sich, getrennt für Erythrozytopoese und Granulozytopoese, der prozentuale Anteil der verschiedenen Zellklassen bei den Kontroll- wie bei den Zusatzkulturen wider, jeweils ins Verhältnis gesetzt zu der bis zur Fixierung der Zellen nach 0, 24, 48 und 72 Std. vergangenen Zeit. Die Summenreifungskurven fassen dementsprechend die Zellausreifungstendenzen in den Kulturen mit und ohne Zusatz von ADRIAMYCIN für mehrere Patienten in e i n e r graphischen Darstellung zusammen.

Der G/E - Index ist als Quotient aus Granulozytopoese und Erythrozytopoese Ausdruck des relativen zahlenmäßigen Verhältnisses aller weißen zur Gesamtzahl der roten Zellen. Eine Mittelwertgraphik sämtlicher Fälle zeigt den G/E - Index für Kontroll- und Zusatzkulturen als Funktion der Zeit.

Getrennt für Erythrozytopoese und Granulozytopoese beschreibt der Mitoseindex die Anzahl der Mitosen auf jeweils 1000 teilungsfähige Zellen, ausgedrückt in Promille; die graphische Veranschaulichung erfolgt wiederum zeitabhängig und gesondert für Kontrollkulturen ohne bzw. Kulturen mit Zusatz des Cytostaticums.

Die karyologischen Kurven vermitteln für die weiße wie für die rote Reihe ein Bild der prozentualen Verteilung der einzelnen Mitosephasen.

ERGEBNISSE

1. Untersuchungsgut
2. Zellmorphologie
3. Reifungskurven
4. a) G/E - Indices
b) Signifikanzberechnung der G/E - Indices
5. a) Mitose - Indices
b) Signifikanzberechnung der Mitose - Indices
6. Karyologische Kurven

Im Verlauf dieser Arbeit gelangten Sternalpunktate folgender Patienten zur Untersuchung:

Patient : F.Z., 83 Jahre, männlich
Einweisung : 29. 08. 72
Diagnose : Bei stationärer Aufnahme bestanden starke Kreuzschmerzen; neben der akuten monozytären Leukämie wurde eine akute Pneumonie festgestellt.

Blutbild : 30. 08. 72

Erythrozyten	$3,19 \times 10^6/\text{mm}^3$
Hb	9,7 g%
Hb _E	$30,4 \times 10^{-12} \text{g}$
Leukozyten	$5900/\text{mm}^3$
Eosinophile	1 %
Myeloblasten	32 %
Myelozyten	3 %
Metamyelozyten	5 %
Stabkernige	13 %
Segmentkernige	34 %
Lymphozyten	12 %
Thrombozyten	$84000/\text{mm}^3$
Reticulozyten	1 ‰
BSG	37/88

Therapie z.Zt. der ersten Sternalpunktion: 02. 08. 72
mit Ausnahme mehrerer Bluttransfusionen
keine spezifische

Lanicor ^R	3 x 1 Tbl./die
Binotal ^R	3 x 1,0 gTbl./die
Depot-Primobolan ^R	100 mg

Therapie z.Zt. der zweiten Sternalpunktion: 30. 08. 72

wie oben, zus. Valium^R 10 mg/die
Fortral^R 3 x 1 Kps./die
Novalgin^R 20 Tr./die

Der Patient verstarb am 04. 10.72 an Bronchopneumonie und Herz-/Kreislaufversagen.

Patient : E.S., 72 Jahre, männlich
Einweisung : 31.08.72
Diagnose : Das bestehende Grundleiden einer monozytären Leukämie war von einer chronischen Lebercirrhose begleitet.
Blutbild : 07.09.72

Erythrozyten	$1,97 \times 10^6/\text{mm}^3$
Hb	6,0 g%
Hb _E	$30,6 \times 10^{-12} \text{g}$
Leukozyten	$1900/\text{mm}^3$
Eosinophile	2 %
Stabkernige	2 %
Segmentkernige	32 %
Lymphozyten	56 %
Monozyten	8 %
Thrombozyten	$266000/\text{mm}^3$
Reticulozyten	---
BSG	45/95
Eisenspiegel	$254 \times 10^{-6} \text{g\%}$

Therapie zur Zeit der Sternalpunktion: 06.09.72

Bluttransfusionen

Ultracorten H ^R	50 mg/die
Salizell ^R	1 Tbl./die
Bisolon ^R	3 x 40 Tr./die
Novodigal ^R	2 x 1 Tbl./die

Nach zweijähriger, regelmäßiger Behandlung in der hämatologischen Ambulanz und mehreren zwischenzeitlichen akuten Schüben kam der Patient am 19.08.74 ad exitum; unmittelbare Todesursache war eine Hirnmassenblutung bei Thrombopenie.

Patient : G.N., 72 Jahre, weiblich
Einweisung : 25. 06. 72
Diagnose : Dominierende Symptome bei der Aufnahme waren Appetitlosigkeit, Müdigkeit und Abgeschlagenheit sowie eine auffallende anämische Blässe von Haut und Schleimhaut; es bestand eine akute Myeloblasten-leukämie mit starker Verdrängung der normalen Hämatopoese.

Blutbild : 28. 07. 72

Erythrozyten	$2,6 \times 10^6/\text{mm}^3$
Hb	7,0 g%
Hb _E	$27,0 \times 10^{-12} \text{ g}$
Leukozyten	$28600/\text{mm}^3$
Myeloblasten	2 %
Paramyeloblasten	16 %
Metamyelozyten	3 %
Stabkernige	30 %
Segmentkernige	43 %
Lymphozyten	6 %
Monozyten	==
Thrombozyten	$49000/\text{mm}^3$
BSG	123/147 (!)

Therapie vor der Sternalpunktion: 01. 08. 72
mit Ausnahme mehrerer Bluttransfusionen
keine spezifische
Cephalotin^R 4 x 2 g/die
Lanitor^R 2 x 0,25 mg/die
Kalinor^R Brausetabl. 2 x 1 Tbl./die

Therapie nach der Sternalpunktion:
wie oben, zus. Endoxan^R 100 mgDrg./die
Vincristin^R 1,2 mg/die i.v.
Methotrexat^R 3 x 2,5 mg/die
Valium^R 10 mg/die

Die Patientin verstarb am 05. 08. 72 im akuten Herz-Kreislaufversagen.

Patient : E.R., 74 Jahre, weiblich
Einweisung : 23.08.73
Diagnose : Neben Altersdiabetes litt die Patientin
an einem Ulcus cruris des linken Unter-
schenkels; die Knochenmarksdiagnose er-
gab eine akute Myeloblastenleukämie.
Blutbild : 25.08.73

Erythrozyten	$2,49 \times 10^6/\text{mm}^3$
Hb	7,6 g%
Leukozyten	$5300/\text{mm}^3$
Myeloblasten	63% (!)
Thrombozyten	$16000/\text{mm}^3$
BSG	82/114

Therapie nach der Sternalpunktion: 27.08.73

zunächst Ultralan^R 100 mg/die
später, nach Anstieg der Thrombozytenwerte auf
32000: Alexan^R 100 mg/die
danach Thrombozytopenie bis auf $1000/\text{mm}^3$;
Infusionen von Vitaminlösungen
Bluttransfusionen

Exitus letalis am 21.10.73 infolge Bronchopneumonie; die
Knochenmarkkontrolle bei der Sektion ergab eine diffuse
Infiltration des Markes mit Myeloblasten bei kaum erkenn-
barer Erythro- und Thrombopoese.

Patient : R.P., 80 Jahre, männlich
Einweisung : 18. 01. 72
Diagnose : Bei starker Gewichtsabnahme und Inappetenz erfolgte Einweisung wegen Gallenblasenhydrops mit Verdacht auf Perforation; die extreme Leukozytose von $50700/\text{mm}^3$ ließ außerdem auf eine hämatologische Systemerkrankung schließen. Die klinische Untersuchung ergab ein Plattenepithelkarzinom der Gallenblase mit Bauchfellkarzinose und Einbruch in den Darm; bei der Knochenmarkdiagnose sprach die starke Linksverschiebung der Granulopoese - trotz des relativ hohen Anteils an Promono- und Monozyten - für eine chronische myeloische Leukämie.

Blutbild : 21. 01. 72

Erythrozyten	$3,84 \times 10^6/\text{mm}^3$
Hb	15,2 g%
Hb _E	$39,6 \times 10^{-12} \text{g}$
Leukozyten	$110000/\text{mm}^3$
Basophile	1%
Eosinophile	1%
Myelozyten	3%
Metamyelozyten	2%
Stabkernige	24%
Segmentkernige	46%
Lymphozyten	---
Monozyten	23%
Thrombozyten	$279000/\text{mm}^3$

Therapie vor der Sternalpunktion: 22.01.72

Terravenös ^R	1 Amp./die i.v.
Tutofusin B ^R	1000 ml/die

noch Patient R.P., Therapie vor der Sternalpunktion

Laevosan DTI ^R	2 Amp./die
Glukose 10 %	1000 ml/die
Xylit	500 ml/die
NaCl 5,85%	120 ml/die
Aminofusin ^R	500 ml/die

Therapie nach der Sternalpunktion:

wie oben,

zusätzlich Myleran^R 4 x 2 mg/die

Am 26.01.72 starb der Patient an Herz-/Kreislaufversagen
im protrahierten Schock.

2. Zellmorphologie

Während in den Originalausstrichen und den aus Kontrollkulturen erstellten Präparaten - abgesehen von einigen ausstrichtechnisch bedingten "nackten Zellkernen" - morphologische Veränderungen der Knochenmarkszellen nahezu vollständig fehlten, konnten in den Kulturen mit ADRIAMYCIN - Zusatz verschiedentlich Abweichungen von der normalen Zellstruktur beobachtet werden. Neben nur vereinzelt auftretenden Megaloblasten und den ebenfalls selten vorkommenden polyploiden Riesenmyeloblasten bzw. -promyelozyten mit teilweise stark verringertem Cytoplasmaanteil, deren Entstehungsursache vermutlich in gestörten Mitoseabläufen im Sinne endomitotischer Reduplikationen zu suchen ist, waren Riesenformen der Metamyelozyten und Stabkernigen sowie übersegmentierte Granulozyten etwas häufiger festzustellen. In beiden Zellreihen ließen sich außer Kernabsprengungen und atypischen Kernformen auch Kernvakuolen, verwaschene Kernstrukturen und aufgelöste Kernmembranen erkennen. Das Vorkommen von Cytoplasmavakuolen blieb dagegen im wesentlichen auf die Zellen der weißen Reihe beschränkt.

3. Reifungskurven (Abb. 18)

Anhand von 6 Sternalpunktaten wurde das Knochenmark von 5 Patienten mit monozytären bzw. myelozytären Leukämien untersucht; aus Frischpräparaten und Knochenmarkkulturen wurden insgesamt 65 000 Zellen differenziert. In 3 Fällen mußte auf die Auswertung der nach 72 Stunden in Kultur angefertigten Ausstrichpräparate verzichtet werden, da aufgrund der fortgeschrittenen Zerfallserscheinungen eine exakte Klassifikation der verschiedenen Zellen nicht mehr möglich war. Der prozentuale Anteil der einzelnen Zellklassen an der Gesamtzahl aller in einem Präparat differenzierten Zellen ist in den Reifungskurven (Abb. 18) additiv als Funktion der Zeit aufgetragen. Da das Resultat im Fall VI (R.P., chronische myeloische Leukämie) im Vergleich zu den übrigen Ergebnissen aus dem Rahmen fällt, blieb es bei der Erstellung von Summenreifungskurven beider Zellreihen unberücksichtigt.

In den folgenden graphischen Darstellungen finden nachstehend aufgeführte Abkürzungen Verwendung:

Erythropoese:

PE = Proerythroblasten
bE = basophile Erythroblasten
pE = polychromatische Erythroblasten
oE = oxyphile Erythroblasten
rE = reife Erythroblasten

Granulopoese:

Mb = Myeloblasten
PMy = Promyelozyten
My = neutrophile Myelozyten
eMy = eosinophile Myelozyten
Mobl = Monoblasten
PMo = Promonozyten

MM = Metamyelozyten
St = neutrophile stabkernige Granulozyten
Seg = neutrophile segmentkernige Granulozyten
eSeg = eosinophile segmentkernige Granulozyten
Mo = Monozyten

weiterhin: rMI = roter Mitoseindex

wMI = weißer Mitoseindex

G/E-I = Verhältnis von Granulopoese zu Erythro-
poese

und:

AMoL = akute monozytäre Leukämie

AML = akute myeloische Leukämie

CML = chronische myeloische Leukämie

Darüber hinaus gelten folgende Kennzeichen:

_____ Kontrollkulturen

----- Zusatzkulturen (ADR - Zusatz
2,0 µg/ml)

Differentialzählung der Knochenmarkzellen

Durch Aufzeichnung in Form von Reifungskurven können die Resultate aus den Differentialzählungen der roten und der weißen Reihe in optimaler Weise veranschaulicht werden. Die mittels Summenreifungskurven der Erythro- und der Granulozytopoese angestrebte Gesamtschau der Ergebnisse mußte allerdings - aufgrund der unterschiedlichen Reifungsneigung - für die Gruppe der akuten monozytären wie für die der akuten myeloischen Leukämien in getrennten graphischen Darstellungen erfolgen.

Akute monozytäre Leukämien:

Fall I F.Z. (Abb.1) AMoL

a. Erythropoese

Die in den Kontrollkulturen nach 24 Stunden festzustellende mäßige Reifungstendenz wird durch Zusatz von ADRIAMYCIN ⁺) weiter verringert.

b. Granulopoese

Bis zu 24 Stunden in Kultur zeigt sich nach ADR nahezu überhaupt keine Wirkung; später kommt es in den Zusatzkulturen zu einer schwachen Reifungsverzögerung, während gleichzeitig in den Kontrollkulturen eine geringfügig beschleunigte Zellausreifung festzustellen ist.

Fall II F.Z., zweites Sternalpunktat (Abb. 2) AMoL

a. Erythropoese

Die in der Kontrollkultur nach 48 Stunden eingetretene leichte Reifungsverzögerung wird durch Zusatz von ADR noch verstärkt.

⁺) Die den Kulturen zugesetzte Menge ADRIAMYCIN betrug grundsätzlich 2,0 µg/ml

b. Granulopoese

In den Kontrollkulturen der weißen Reihe ist eine verzögerte Ausreifung zu beobachten; diese Tendenz tritt in den ADRIAMYCIN - behandelten Kulturen mit Ausnahme der Promono - und der Metamyelozyten noch deutlicher hervor.

Fall III E.S. (Abb. 3) AMoL

a. Erythropoese

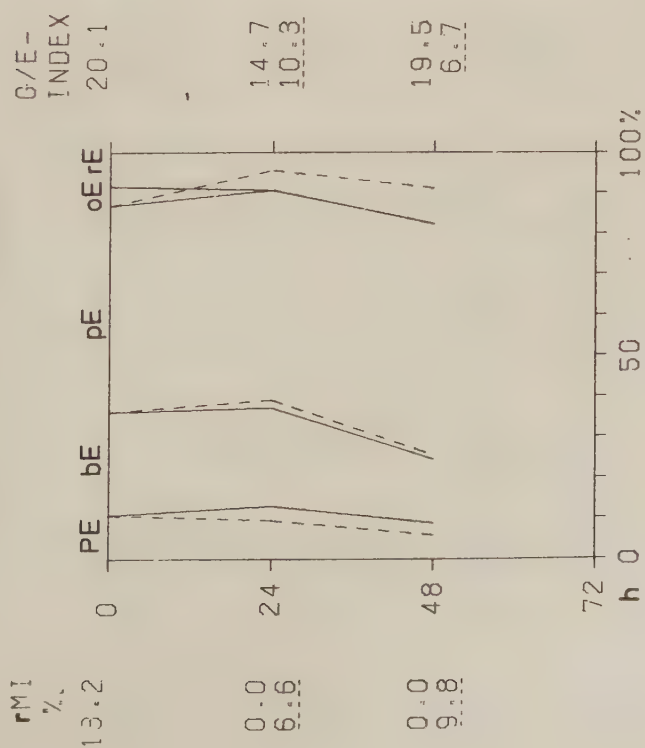
Nach Zusatz des Cytostaticums ergibt sich eine gegenüber den Kontrollwerten zunächst beschleunigte Zellausreifung, die aber nach 72 Stunden in eine Reifungsverzögerung übergegangen ist.

b. Granulopoese

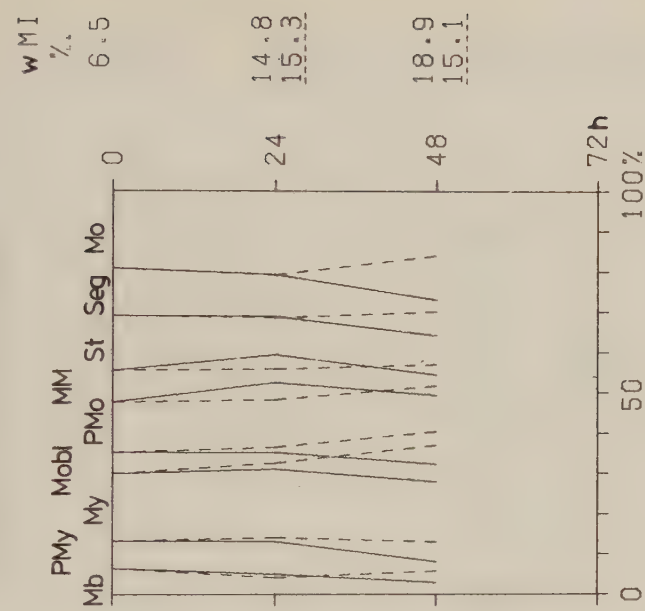
Die Reifung erfährt durch den ADR - Zusatz im Vergleich zur unbeeinflussten Kultur eine eindeutige Verzögerung; der für eine monozytäre Leukämie verhältnismäßig hohe Promyelozytenanteil verringert sich dagegen während der dreitägigen Einwirkungsdauer des Anthrazyklins durch Ausreifung zum Myelozyten erheblich.

REIFUNGSKURVEN FALL ROEM. 1. PAT. F.Z., AMOL ---- ZUSATZ *ADRIAMYCIN* ——— KONTROLLE

ERYTHROZYTPOESE



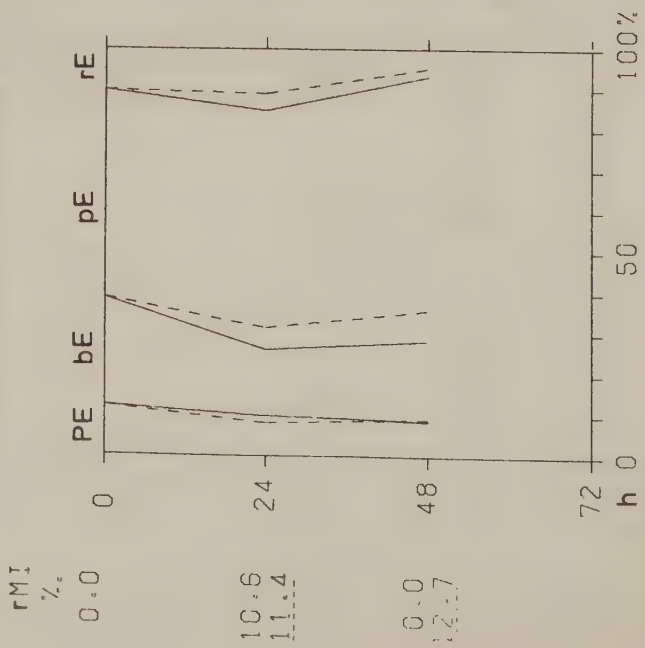
GRANULOZYTPOESE



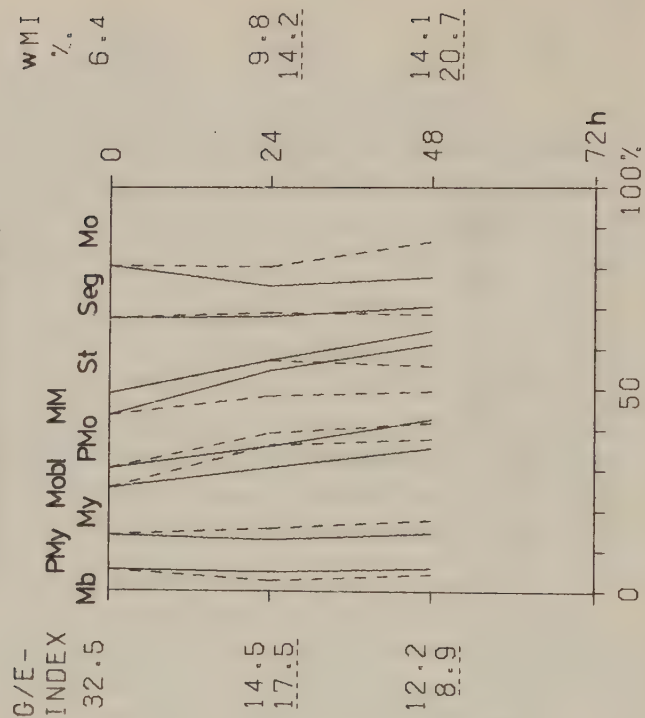
LEGENDE SIEHE SEITEN 33/34

REIFUNGSKURVEN FALL ROEM. 2, PAT. F.Z., AMOL ---- ZUSATZ *ADRIAMYCIN* ——— KONTROLLE

ERYTHROZYTPOESE

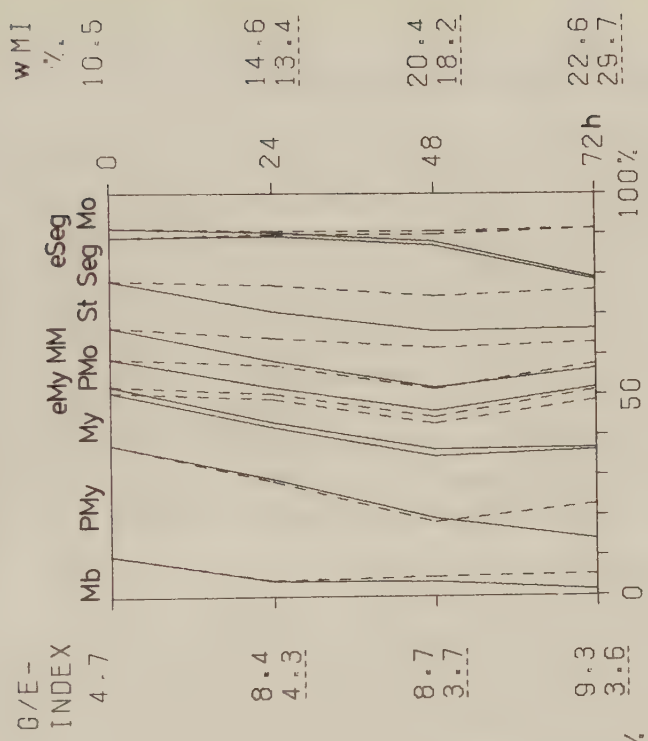
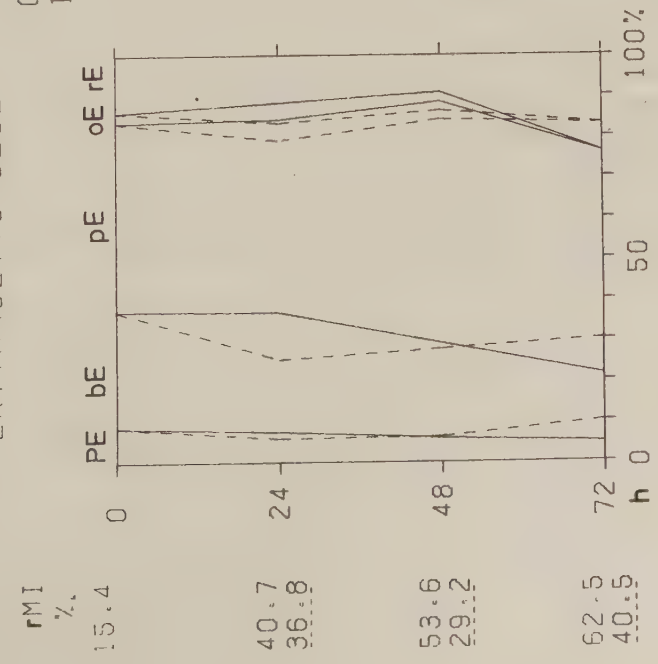


GRANULOZYTPOESE



ERYTHROZYTPOESE

GRANULOZYTPOESE



Summenreifungskurven der AMoL (Abb. 4)

a. Erythropoese

Während in vitro die Erythropoese im normalen Knochenmark und noch weit mehr bei den akuten myeloischen und monozytären Leukämien üblicherweise das Bild einer starken Reifungsförderung zeigt (9,11), wird aus der vorliegenden Summenreifungskurve aller akuten monozytären Leukämien für die Kontrollkulturen nur eine geringe Reifungsneigung erkennbar. Der Effekt des ADRIAMYCINS auf die Zellen der roten Reihe bleibt eher unbedeutend; während die Reifung bis zu 48 Stunden in Kultur noch geringfügig beschleunigt ist, erscheint sie nach 72-stündiger Inkubationszeit wieder leicht verzögert.

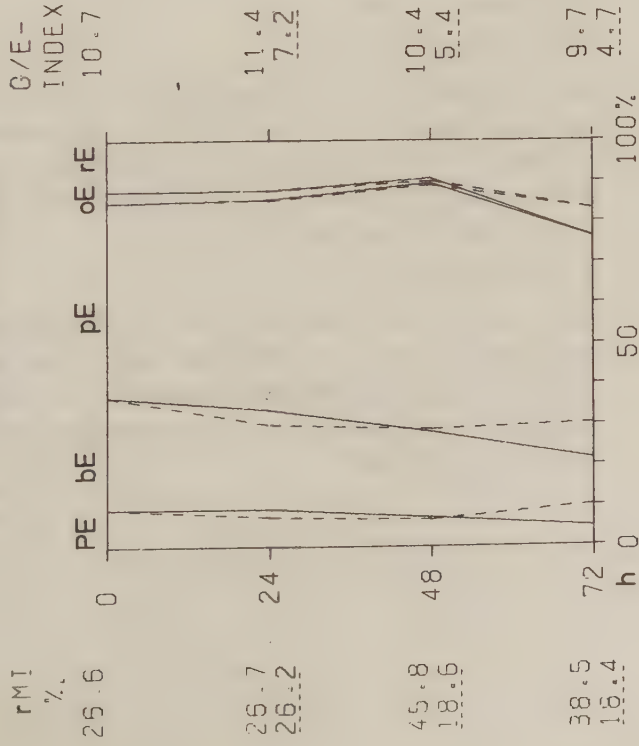
b. Granulopoese

Bei den Patienten mit akuten monozytären Leukämien finden sich neben den normalerweise im Knochenmark kaum vertretenen Monoblasten vermehrt Promonozyten und Monozyten; diese Erhöhung des Anteils an monozytären Elementen erfolgt vor allem auf Kosten der reiferen Zellstufen der Myelopoese. Die in den unbehandelten Kulturen ohnehin merklich verringerte Zellausreifung erweist sich unter dem Einfluß von ADR nach 2..3 Kulturtagen als eindeutig gehemmt. In den vorliegenden Reifungskurven ergaben sich keine Anzeichen für eine Verringerung des prozentualen Anteils monozytärer Vorstufen durch ADRIAMYCIN.

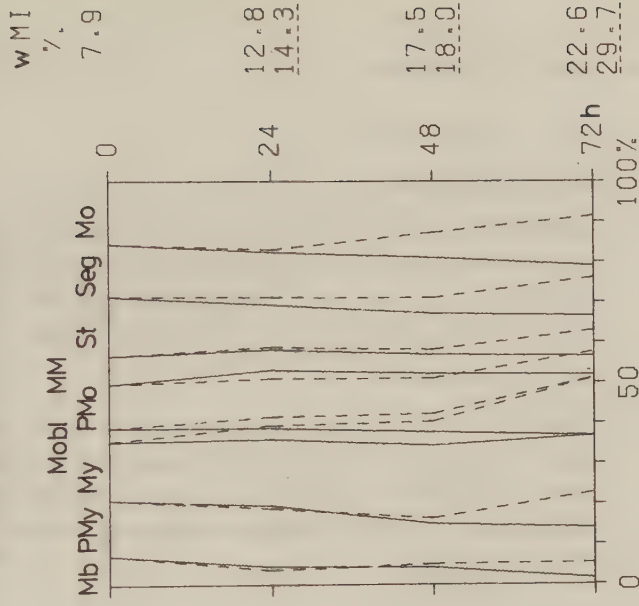
SUMMENREIFUNGSKURVEN FAELLE ROEM. 1. . . 3

----- ZUSATZ *ADRIAMYCIN* ——— KONTROLLE

ERYTHROZYTPOESE



GRANULOZYTPOESE



LEGENDE SIEHE SEITEN 33/34

Akute myeloische Leukämien:

Fall IV G.N. (Abb. 5) AML

a. Erythropoese

Unter dem Einfluß von ADR zeigt sich schon nach 24 Stunden eine eindeutige Rechtsverschiebung der basophilen und der polychromatischen Erythroblasten gegenüber den Kontrollwerten.

b. Granulopoese

Während in den Kontrollkulturen kaum eine Tendenz zur Ausreifung besteht, sind die Kurven der Zusatzkulturen deutlich linksverschoben; das Cytostaticum bewirkt demnach eine verstärkte Reifungsförderung.

Fall V E.R. (Abb. 6) AML

a. Erythropoese

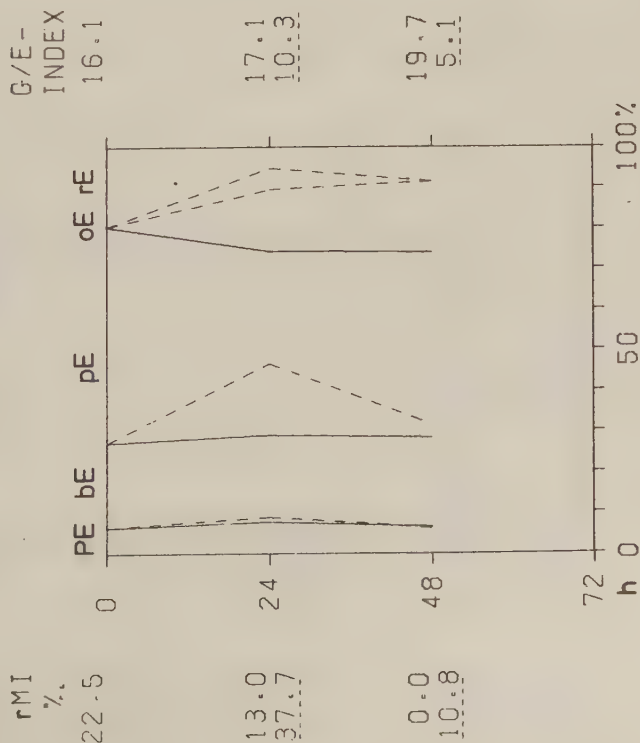
Mit Ausnahme der Proerythroblasten ist in den Zusatzkulturen eine klare Rechtsverschiebung der gesamten Erythropoese zu beobachten, die sich aber nach 72-stündiger Kultivierungszeit wieder weitgehend normalisiert.

b. Granulopoese

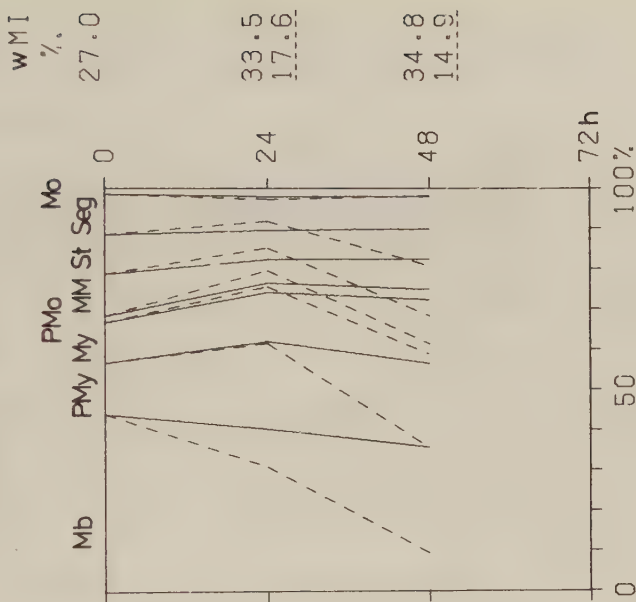
Auch für die weiße Reihe dieser Knochenmarkkultur präsentieren sich die unter ADR - Zusatz erzielten Reifungskurven im Vergleich zu denen der unbehandelten Kontrollen in eindrucksvoller Weise linksverschoben.

REIFUNGSKURVEN FALL ROEM. 4, PAT. G.N., AML ---- ZUSATZ *ADRIAMYCIN* ——— KONTROLLE

ERYTHROZYTPOESE



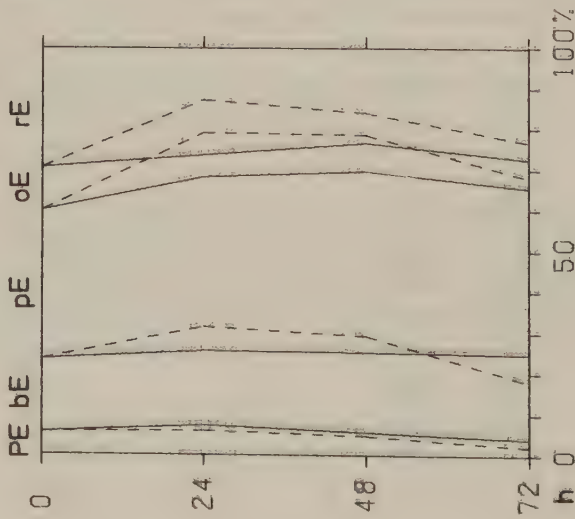
GRANULOZYTPOESE



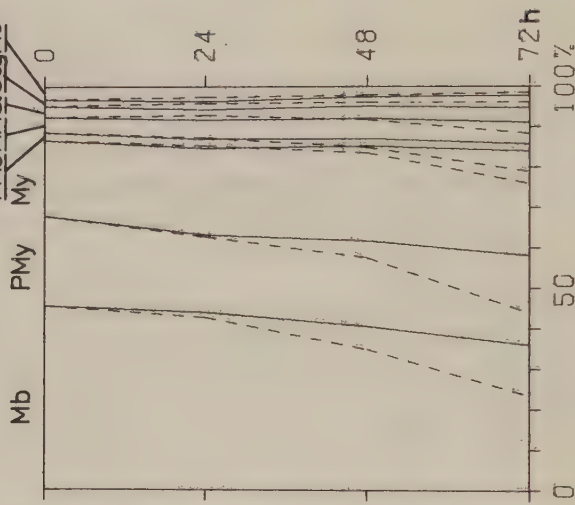
REIFUNGSKURVEN FALL ROEM. 5, PAT. E.R., AML ---- ZUSATZ *ADRIAMYCIN* ——— KONTROLLE

ERYTHROZYTPOESE

rMI
%

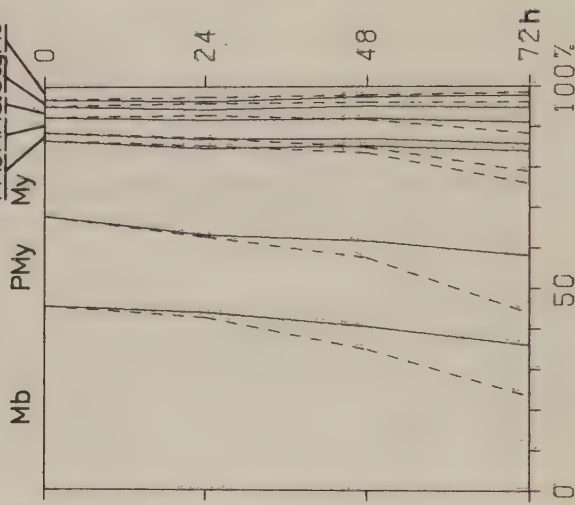


G/E-
INDEX



GRANULOZYTPOESE

wMI
%



Summenreifungskurven der AML (Abb. 7)

a. Erythropoese

Die Erythropoese zeigt - ähnlich wie bei den zuvor beschriebenen akuten monozytären Leukämien - auch für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten akuten myeloischen Leukämien ein von den aus der Literatur bekannten Werten (9,11) abweichendes Reifungsverhalten. Die Summenreifungskurve der Kontrollkulturen spiegelt nur eine sehr geringe Reifungsneigung wider. Durch ADRIAMYCIN wird die Ausreifung der erythropoetischen Vorstufen mit Ausnahme der Proerythroblasten zunächst stark verzögert; nach 3 Tagen in Kultur gleichen sich die Werte der Zusatzkulturen wieder weitgehend denen der Kontrollkulturen an.

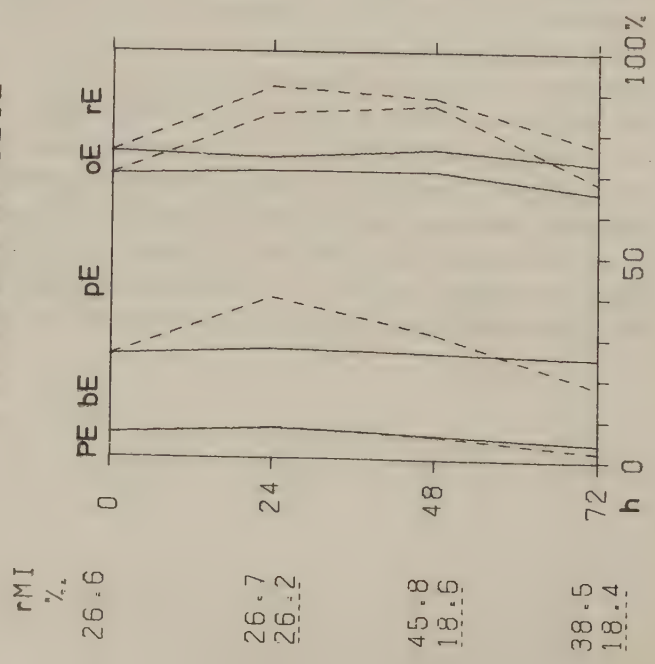
b. Granulopoese

Bei den akuten Myeloblastenleukämien zeigt sich die Summenreifungskurve für die Granulopoese unter dem Einfluß von ADR nach zweitägiger Inkubationszeit der Kulturen gegenüber den - wie auch von BOLL (8.1,8.2) angegeben - nur schwach ausreifenden Kontrollen eindeutig linksverschoben; vor allem der Myeloblast als unreifste Zelle der Myelopoese läßt eine signifikante Abnahme seines in den Kontrollpräparaten stark überhöhten prozentualen Anteils an der Gesamtzahl aller Zellen der weißen Reihe erkennen. An Hand der massiven Zunahme der Myelozyten, in geringerem Umfang auch der reiferen Zellstufen der Granulozytopoese wird die verstärkte Reifungsförderung durch ADRIAMYCIN in den Zusatzkulturen besonders evident.

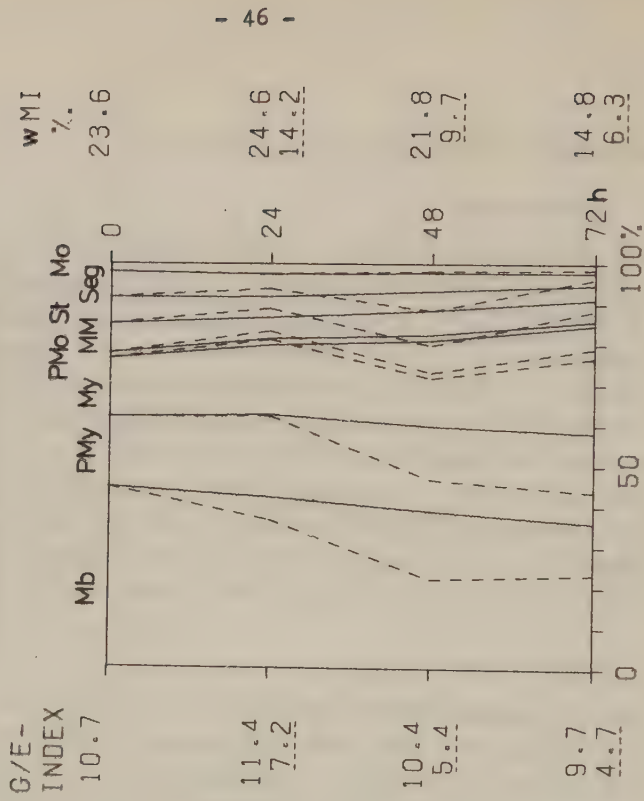
SUMMENREIFUNGSKURVEN FÄLLE ROEM. 4 + 5

----- ZUSATZ *ADRIAMYCIN* ——— KONTROLLE

ERYTHROZYTPOESE



GRANULOZYTPOESE



Ein abweichendes Reifungsverhalten zeigt die CML, die daher gesondert betrachtet werden muß:

Fall VI R.P. (Abb. 8) CML

a. Erythropoese

Abgesehen von einem erhöhten Prozentsatz oxyphiler Erythroblasten zeigen die erythropoetischen Zellen eine normale Differentialverteilung. Während bis zu 48 Stunden in den Kontrollpräparaten eine beschleunigte Reifung zu verzeichnen ist, erscheint diese - vermutlich wegen der Umwandlung zahlreicher reifer Erythroblasten zu Erythrozyten (9) am dritten Kulturtag stark verzögert. In den Zusatzkulturen bewirkt das Cytostaticum bei mäßiger Reifungsverzögerung vor allem eine Zunahme der polychromatischen Erythroblasten.

b. Granulopoese

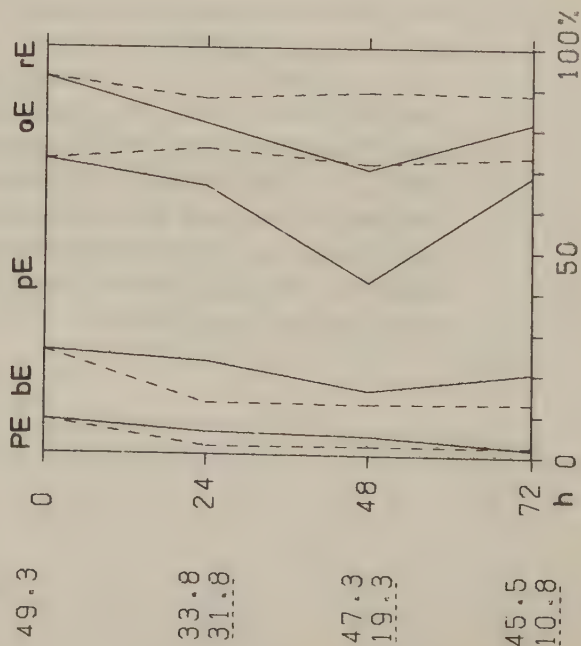
Bei sonst normaler Differentialverteilung fällt im Originalpräparat neben einer relativ großen Zahl von Promonozyten und Monozyten vor allem der beträchtlich erhöhte Promyelozytenanteil auf. Dementsprechend nehmen in den Kontrollkulturen mit längerer Inkubationsdauer bei schwacher Ausreifung die Myelozytenzahlen zu (8.1). Nach Zusatz von ADRIAMYCIN zum Kulturmedium ergibt sich für die gesamte Granulopoese eine klare Reifungsverzögerung.

REIFUNGSKURVEN FALL ROEM. 6, PAT. R.P., CML ---- ZUSATZ *ADRIAMYCIN* ——— KONTROLLE

ERYTHROZYTPOESE

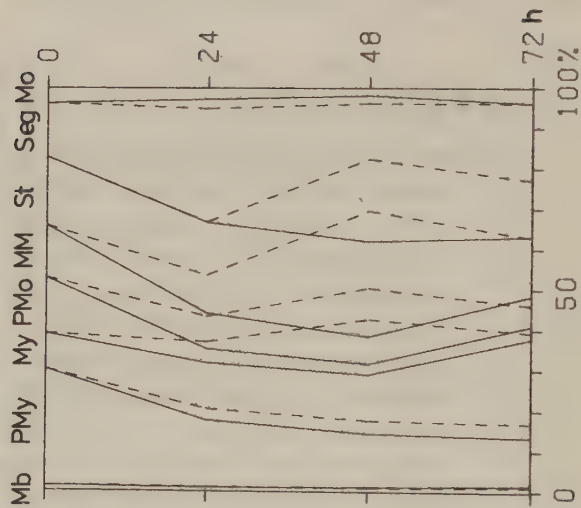
rMI
%

G/E-
INDEX



GRANULOZYTPOESE

wMI
%



4a. G/E - Indices

- Tabelle A und Mittelwertkurve aller Fälle (Abb. 9) -

Die G/E-Indices der akuten myeloischen und monozytären Leukämien, in geringerem Maße auch die der chronisch myeloischen Leukämie zeigen sämtlich eine deutliche Steigerung gegenüber den Vergleichswerten für normales Knochenmark gesunder Menschen und bewegen sich damit im Rahmen der Erwartung (8.1,9,13). Eine Zusammenfassung sämtlicher Resultate und die Aufzeichnung dieser Durchschnittswerte in Form von Mittelwertskurven erscheint demnach durchaus zulässig.

In Übereinstimmung mit BOLL (8.1,9) ergibt sich in den unbeeinflussten Kontrollpräparaten aller drei Leukämieformen über die gesamte Kulturdauer von 3 Tagen keine wesentliche Veränderung des G/E - Index. In den ADRIAMYCIN-behandelten Kulturen läßt sich in allen Fällen, wie auch aus Abb. 9 zweifelsfrei hervorgeht, eine markante zeitabhängige Abnahme der G/E - Indices und damit eine beträchtliche Verringerung des Anteils der weißen gegenüber den roten Zellen beobachten. Dies steht ebenfalls in Einklang mit ähnlichen Ergebnissen von BOLL (11), allerdings an nicht leukämisch verändertem Knochenmark.

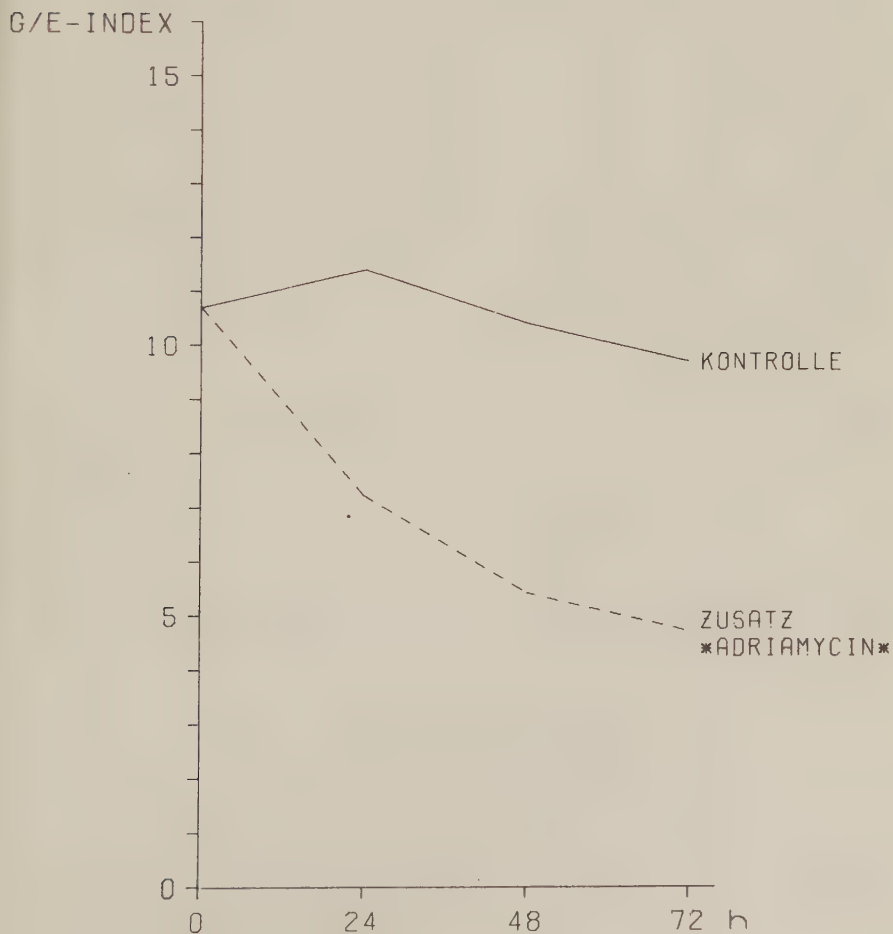
TABELLE A

G/E - Indices

Fall	Original- präparat	Kontrollen			Zusatz		
		24	48	72 h	24	48	72 h
I	20,1	14,7	19,5	--	20,3	6,7	--
II	32,5	14,5	12,2	--	17,5	8,9	--
III	4,7	8,4	8,7	9,3	4,3	3,7	3,6
IV	16,1	17,1	19,7	--	10,3	5,1	--
V	12,3	10,0	9,5	9,3	10,0	9,0	6,5
VI	7,0	9,4	7,7	10,3	3,5	3,4	3,3
Summen-	9512	9018	7968	3621	9361	8757	2488
mittel-							
wert	887	794	765	327	1298	1628	526
=	10,7	11,4	10,4	9,7	7,2	5,4	4,7

G/E - INDICES

MITTELWERTKURVEN DER FÄLLE ROEM. 1...6



4b. Signifikanzberechnung der G/E - Indices (Tabelle B)

Die Signifikanzberechnung für die G/E - Indices der Kontroll- und Zusatzkulturen aller 6 Fälle wurde nach dem von HELMERT PEARSON angegebenen χ^2 -Verfahren durchgeführt; die Auswertung erfolgte auf Unterschied. Bei zwei verschiedenen Kulturansätzen war demnach 1 Freiheitsgrad zu berücksichtigen. Zur Ermittlung der Wahrscheinlichkeit "P" aus dem zuvor errechneten χ^2 wurden die von PÁTAU erstellten graphischen Tafeln benutzt. Werte von "p" $\leq 10^{-6}$ gelten unter den angegebenen Konditionen als Hochsignifikant; bei entsprechendem Ergebnis sind die gegenüber den Kontrollkulturen in den Zusatzkulturen aufgetretenen Veränderungen des zahlenmäßigen Verhältnisses der Zellen der weißen und der roten Reihe (G/E - Index) als statistisch einwandfrei gesichert anzusehen. Die Möglichkeit zufallsbedingter Unterschiede wird damit vernachlässigbar gering.

Die Berechnung des χ^2 erfolgte nach der Formel

$$\chi^2 = \sum \frac{(B - E)^2}{E}$$

"B" steht für die in den Kontroll- und Zusatzkulturen ermittelte Anzahl granulopoetischer bzw. erythropoetischer Zellen, "E" bezeichnet die entsprechenden Erwartungswerte:

BG = Beobachtungswert Granuloblasten

BE = Beobachtungswert Erythroblasten

EG = Erwartungswert Granuloblasten

EE = Erwartungswert Erythroblasten

Weiterhin wurden in den für beide Meßreihen getrennt angestellten Berechnungen die für Kontroll- und Zusatzkulturen eingesetzten Werte mit "K" bzw. "Z" gekennzeichnet.

G/E-INDEX FAELLE ROEM. 1...6

KONTROLLE

ZUSATZ

STUNDEN	NULL	24	48	72	24	48	72
FALL:	GRN/ERY	GRN/ERY	GRN/ERY	GRN/ERY	GRN/ERY	GRN/ERY	GRN/ERY
POEM. 1	1568.	83.796.	54.876.	45.	1637.	159.1511.	224.
POEM. 2	1591.	49.1618.	111.1431.	117.	1728.	99.1472.	166.
POEM. 3	1426.	708.1637.	135.1507.	185.	42.1398.	297.1330.	357.
POEM. 4	1789.	111.1779.	104.908.	45.	1731.	158.1571.	305.
POEM. 5	1519.	123.1148.	149.1409.	159.1565.	168.1489.	149.1506.	168.1485.
POEM. 6	1526.	219.1718.	132.1643.	214.1663.	162.1378.	396.1368.	408.682.
SUMME	3312.	387.2618.	734.7968.	765.3621.	372.3361.	1239.8757.	1528.2488.

SIGNIFIKANZBERECHNUNG DES G/E-INDEX FUEP KONTROLL- UND ZUSATZKULTUREN GEMAESS DEM X**2-TEST (JACK PEARSON). - (LIES: CHI-QUADRATE-TEST)

LEGENDE: RG=BEOBSACHTUNGSWERT GRANULORLASTEN, RE=BEOBSACHTUNGSWERT ERYTHROPLASTEN
EG=ERWARTUNGSWERT GRANULORLASTEN, EE=ERWARTUNGSWERT ERYTHROPLASTEN

G/E-INDEX.- 2,1 GAMMA/ML ADRIAMYCIN ALLES FAELLE (ROEM. 1..6) FUEP 24 UND 48 STUNDEN.-
***** FUEP 72 STUNDEN NUR FAELLE ROEM. 3, 5 UND 6

24 STD.	RG	RE	RG+EE	EG	EE
KONTROLLE	918.0500	794.0000	9812.0000	9809.2789	1002.7211
ZUSATZ	9361.0000	1298.0000	10659.0000	9569.7211	1089.2739
SUMME	18379.00		20471.0000		

(KBE-KEE)**2/KEE		(ZBG-ZEG)**2/ZEG		(ZBE-ZEE)**2/ZEE	
4.9453	43.4463	4.5523	39.9939		
SUMME (X**2) =	92.9378	BEI 1 FREIHEITSGRAD IST: P= LT.	1.0E-10		
(LIES: KLEINER ALS 1 MAL 10 HOCH MINUS 10)					

48 STD.	BE	B(G+E)	EG	EE	
KONTROLLE	7968.0000	8733.0000	7639.8904	1093.1096	
ZUSATZ	8757.0000	10385.0000	9085.1096	1299.8904	
SUMME	16725.0000	19118.0000			
(KBE-KEE)**2/KEE		(ZBG-ZEG)**2/ZEG		(ZBE-ZEE)**2/ZEE	
14.0913	98.4859	11.8497	82.8192		
SUMME (X**2) =	207.2461	BEI 1 FREIHEITSGRAD IST: P= LT.	1.0E-10		
(LIES: KLEINER ALS 1 MAL 10 HOCH MINUS 10)					

72 STD.	BE	B(G+E)	EG	EE	
KONTROLLE	3621.0000	3993.0000	3481.2669	511.7331	
ZUSATZ	2488.0000	3014.0000	2627.7331	386.2669	
SUMME	6109.0000	7007.0000			
(KBE-KEE)**2/KEE		(ZBG-ZEG)**2/ZEG		(ZBE-ZEE)**2/ZEE	
5.6087	38.1553	7.4305	50.5488		
SUMME (X**2) =	101.7434	BEI 1 FREIHEITSGRAD IST: P= LT.	1.0E-10		
(LIES: KLEINER ALS 1 MAL 10 HOCH MINUS 10)					

5a. Mitose - Indices (Tabellen C,D,E und Abb. 10..12)

Neben der karyologischen Kurve ist der Mitose - Index das entscheidende Kriterium für die Beurteilung der Regenerationsaktivität von Knochenmarkszellen. In der Erythropoese streuen die Mitoseraten in den einzelnen Fällen zum Teil erheblich; ein einheitliches Bild ergibt sich erst aus den Mittelwertkurven (Tab. C und Abb. 10) sämtlicher untersuchten Knochenmarkskulturen: Während für die normale Erythropoese wie auch bei AMoL, AML und CML im unbeeinflussten Sternalmark die Mitose - Indices der roten Reihe mit zunehmender Kulturdauer gewöhnlich stark rückläufig sind (9), zeigten sie in dieser Studie bis zu 48 Stunden in Kultur eine deutlich steigende Tendenz und fielen erst am dritten Tag wieder mäßig ab. Demgegenüber war in den ADRIAMYCIN - behandelten Kulturen ein stetiges Absinken der Mitose - Indices der erythropoetischen Zellen über die gesamte Inkubationsdauer von 72 Stunden zu verzeichnen.

In der Granulopoese mußte die summarische Betrachtung für die Gruppen der monozytären und myeloischen Leukämien getrennt erfolgen. Die bei den AMoL während der dreitägigen Kultivierungszeit in den Kontrollpräparaten festzustellende kontinuierliche Steigerung der Mitoseraten ist ungewöhnlich (8.1,8.2); allerdings bewirkt auch ADR in diesen Fällen keine Verminderung der Mitosehäufigkeit (Tab. D, Abb. 11). Dabei war in den Kontroll- wie in den Zusatzkulturen ein besonders hoher Anteil an Promonozytenmitosen zu bemerken. - Bei der akuten wie bei der chronischen myeloischen Leukämie ist die Regenerationsaktivität dagegen schon in den unbehandelten Kontrollkulturen rückläufig; unter dem Einfluß des Cytostaticums kommt es im Verlaufe der 72-stündigen Kultivierungsdauer erwartungsgemäß (11) zu einer weiteren, stetig verlaufenden beträchtlichen Senkung der Mitoseraten (Tab. E, Abb. 12).

TABELLE C

Mitose - Indices der Erythropoese
(Angaben in ‰)

Fall	Original- präparat	Kontrollen			Zusatz		
		24	48	72 h	24	48	72 h
I	13,2	--	--	--	6,6	9,8	--
II	--	10,6	--	--	11,4	12,7	--
III	15,4	40,7	53,6	62,5	36,8	29,2	40,5
IV	22,5	13,0	--	--	37,7	10,8	17,1
V	23,0	18,3	33,1	24,6	7,7	28,4	--
VI	49,3	33,8	47,3	45,5	31,8	19,3	10,8
Summen- mittel- wert	19000 715	16000 600	20000 437	11000 286	30000 1147	27000 1453	8000 434
=	26,6	26,7	45,8	38,5	26,2	18,6	18,4

TABELLE D

Mitose - Indices der Granulopoese, AMoL
(Angaben in ‰)

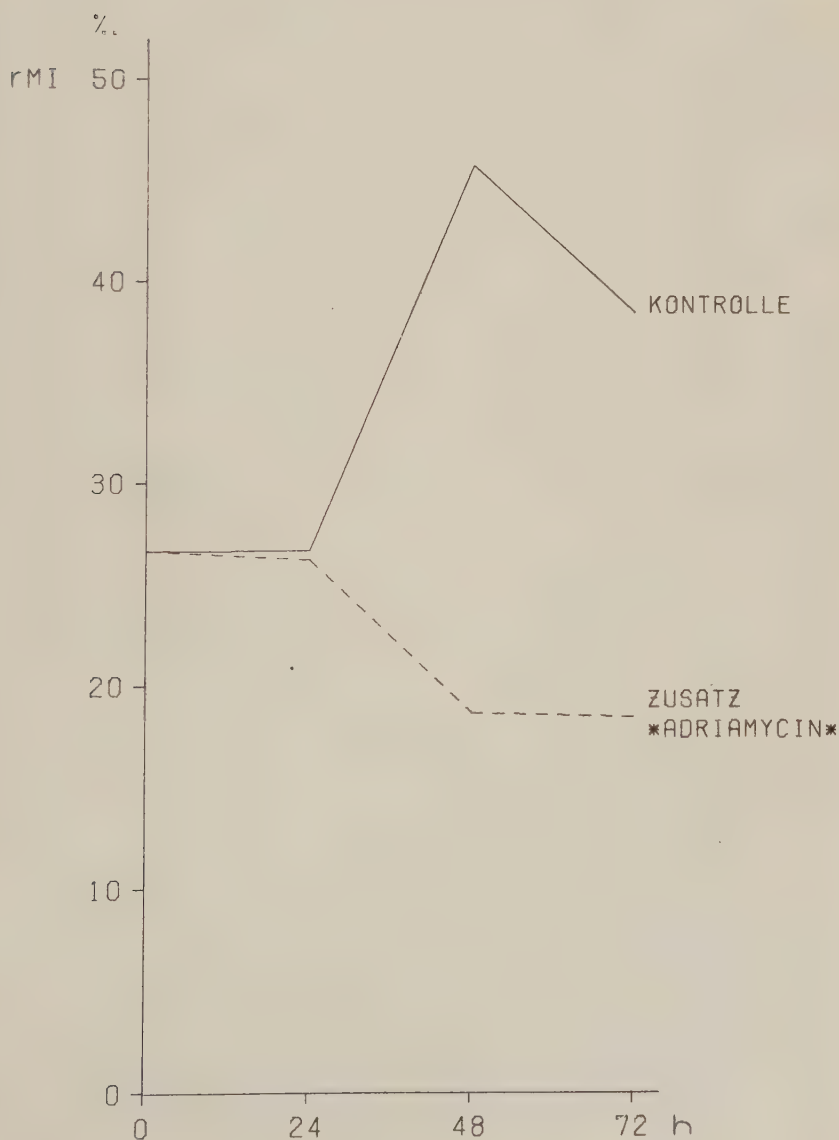
Fall	Original- präparat	Kontrollen			Zusatz		
		24	48	72 h	24	48	72 h
I	6,5	14,8	18,9	--	15,3	15,1	--
II	6,4	9,8	14,1	--	14,2	20,7	--
III	10,5	14,6	20,4	22,6	13,4	18,2	29,7
Summen- mittel- wert	21000 2653	30000 2352	39000 2231	5000 221	40000 2796	45000 2505	6000 202
=	7,9	12,8	17,5	22,6	14,3	18,0	29,7

TABELLE E

Mitose - Indices der Granulopoese, AML u. CML
(Angaben in %)

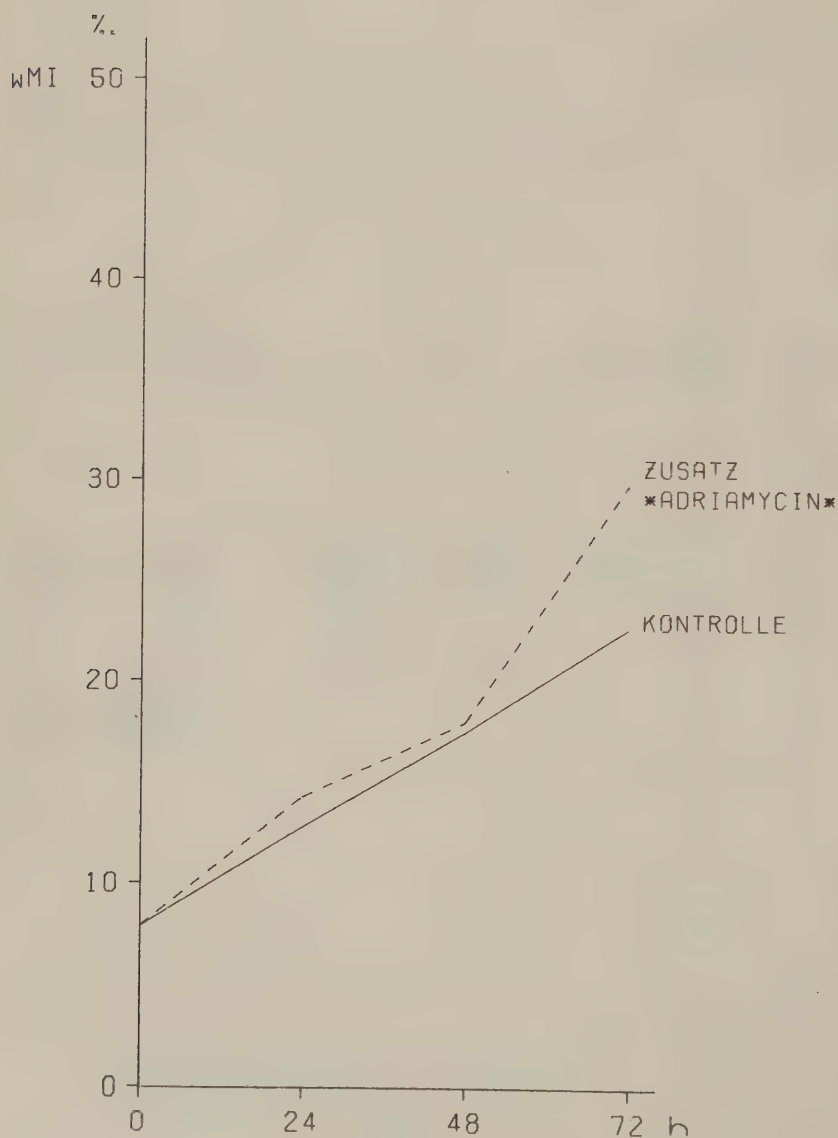
Fall	Original- präparat	Kontrolle			Zusatz		
		24	48	72 h	24	48	72 h
IV	27,0	33,5	34,8	--	17,6	14,9	--
V	14,2	16,2	15,2	13,3	10,8	9,4	7,6
VI	31,9	22,4	20,7	17,5	13,6	4,2	2,3
Summen- mittel- wert	90000 3816	88000 3582	60000 2755	33000 2226	51000 3597	33000 3400	11000 1740
=	23,6	24,6	21,8	14,8	14,2	9,7	6,3

MITOSE-INDICES DER ERYTHROPOËSE MITTELWERTKURVE FÄLLE ROEM. 1...6

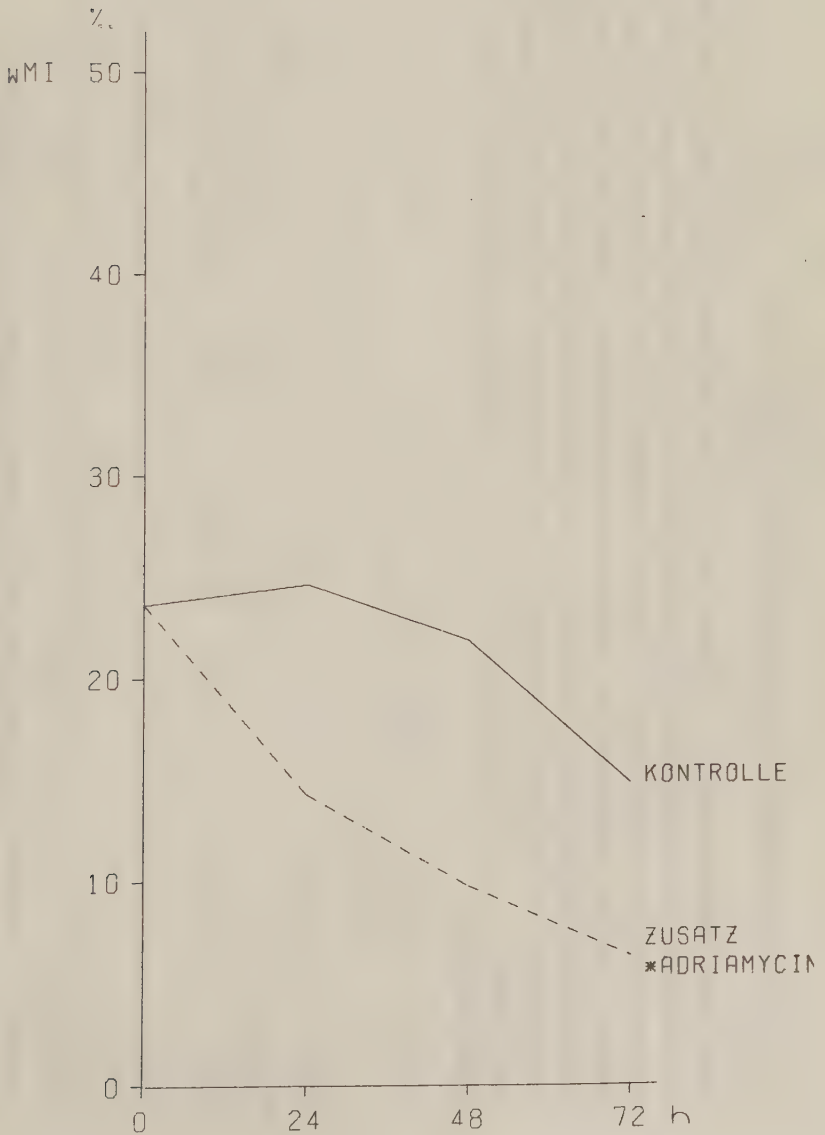


MITOSE-INDICES DER GRANULOPOESE

MITTELWERTKURVE FÄLLE ROEM. 1. 3



MITOSE-INDICES DER GRANULOPOESE MITTELWERTKURVE FÄLLE ROEM. 4...6



5b. Signifikanzberechnung der Mitose - Indices (Tabelle F)

Eine Signifikanzberechnung erfolgte lediglich für die Werte der Mitose - Indices der weißen Reihe bei den myeloischen Leukämien; der bereits bei der Berechnung der G/E - Indices ausführlich beschriebene χ^2 - Test von HELMERT PEARSON gelangte dabei erneut zur Anwendung. Für die Auswertung auf Unterschied war wiederum 1 Freiheitsgrad zu berücksichtigen; die Differenz der Mitosewerte ist statistisch gut gesichert bei einer Wahrscheinlichkeit von "p" $\leq$ 0,0027. Damit konnte eine signifikante Abnahme der Mitoseraten nach Zusatz von 2,0 μ g/ml ADRIAMYCIN außer für die 3 Tage alte Kultur zweifelsfrei nachgewiesen werden.

WEISSER MITOSE-INDEX FÄLLE ROEM. 4..6

KONTROLLE:

STUNDEN:	NULL	24	48	72	ZUSATZ:	48	72
FALL:	BM/B (M+N)	BM/B (M+N)	BM/B (M+N)	BM/B (M+N)	BM/B (M+N)	BM/B (M+N)	BM/B (M+N)
ROEM. 4	38. 1407.	49. 1454.	26. 748.	26. 1476.	16. 1073.	13. 1378.	10. 1312.
ROEM. 5	20. 1405.	22. 1358.	21. 1379.	19. 1425.	15. 1383.	4. 949.	1. 428.
ROEM. 6	32. 1004.	17. 760.	13. 628.	14. 801.	10. 738.	33. 3400.	11. 1740.
SUMME:	90. 3816.	88. 3582.	60. 2755.	33. 2226.	51. 3597.		

SIGNIFIKANZBERECHNUNG AUF ABWEICHENDE MITOSENVERTEILUNG FÜR KONTROLL- UND ZUSATZKULTUREN
GEMÄSS DEM χ^2 -TEST (NACH PEARSON). - (LIES: CHI-QUADRAT-TEST)

LEGENDE: BM=BEOBSACHTUNGSWERT *MITOSEN*, BN=BEOBSACHTUNGSWERT *NICHTMITOSEN*
EM=ERWARTUNGSWERT *MITOSEN*, EN=ERWARTUNGSWERT *NICHTMITOSEN*

GRANULOPOESE.- 2,0 GAMMA/ML ADRIAMYCIN.- FALL ROEM. 4 NUR FÜR 24 UND 48 STUNDEN; FÄLLE
***** ROEM. 5 UND 6 FÜR 24, 48 UND 72 STUNDEN

KONTROLLE	88.0000	3434.0000	3582.0000	69.3548	3512.6452
ZUSATZ	51.0000	3545.0000	3597.0000	69.5452	3527.3548
SUMME	139.0000		7179.0000		
	(RM-EM) **2/EM	(RM-EN) **2/EN	SUM(B-E) **2/E		
KONTROLLE	5.0125		5.1115		
ZUSATZ	4.0310		5.0912		
***2=	10.0437	BEI 1 FREIHEITSGRAD IST: P=	.00150		
4A STD.	BM	BN	3(M+N)	EM	EN
KONTROLLE	50.0000	2695.0000	2755.0000	41.6271	2713.3729
ZUSATZ	33.0000	3257.0000	3400.0000	51.3729	3348.6271
SUMME	93.0000		5155.0000		
	(RM-EM) **2/EM	(RM-EN) **2/EN	SUM(B-E) **2/E		
KONTROLLE	8.1192		.1244	8.2336	
ZUSATZ	6.5708		.1008	6.6716	
***2=	14.6902	BEI 1 FREIHEITSGRAD IST: P=	.00012		
7E STD.	BM	BN	3(M+N)	EM	EN
KONTROLLE	33.0000	2193.0000	2226.0000	24.6959	2201.3041
ZUSATZ	11.0000	1729.0000	1740.0000	19.3041	1720.6959
SUMME	44.0000		3966.0000		
	(RM-EM) **2/EM	(RM-EN) **2/EN	SUM(B-E) **2/E		
KONTROLLE	3.7923		.0313	2.8236	
ZUSATZ	3.5722		.0401	3.6123	
***2=	6.4359	BEI 1 FREIHEITSGRAD IST: P=	.01100		

6. Karyologische Kurven (Tabellen G,H und Abb. 13,14)

Bei insgesamt 131 roten und 552 weißen Mitosen erschien eine nach Zellklassen getrennte Darstellung des jeweiligen Anteils der einzelnen Phasen an der Gesamtzahl aller Mitosen ebenso wenig zweckmäßig wie die separate Erstellung karyologischer Kurven für jeden einzelnen Patienten. Es wurden deshalb in der Erythrozytopoese wie in der Granulozytopoese lediglich Summenkurven der Kontroll- bzw. Zusatzkulturen aufgezeichnet.

Wie in der normalen Erythropoese (9) finden sich auch bei den monozytären und myeloischen Leukämien in den unbehandelten Kulturen betont häufig späte Metaphasen. Unter ADR - Zusatz zeigt sich eine klare Verlagerung des Hauptteils der Mitosen zu den Anaphasen.

Die karyologischen Kurven der Granulopoese lassen für die Kontrollkulturen ebenfalls ein deutliches Übergewicht der späten Metaphasen erkennen (8.1,8.2). Wie schon vorangegangene ähnliche Untersuchungen von BOLL (11) an nicht leukämischem Knochenmark gezeigt hatten, wird auch bei den monozytären und myeloischen Leukämien die karyologische Kurve der weißen Reihe durch ADRIAMYCIN nicht merklich beeinflusst.

TABELLE H

Verteilung der Mitosephasen der Granulopoese

Fall	Prophasen			frühe Metaphasen			späte Metaphasen			Anaphasen			Telophasen			Rekonstruk- tionsphasen		
	K	Z	K	K	Z	K	K	Z	K	K	Z	K	K	Z	K	K	Z	K
I	2	1	10	11	7	7	--	--	--	1	4	2	4					
II	3	8	5	1	12	6	--	--	12	5	2	2	2					
III	9	3	6	7	9	9	12	4	5	5	5	5	5					
IV	28	6	23	14	32	8	24	7	3	3	3	3	4					
V	10	7	24	8	29	16	11	4	5	2	3	1						
VI	8	2	13	1	11	4	27	5	13	1	4	2						
Summe K	60	81	100	74	32	19												
%	16,4	22,1	27,3	20,2	8,8	5,2												
Summe Z		27	42	50	32	17												
%		14,5	22,6	26,9	17,2	9,1												

Legende: K = Kontrolle

Z = Zusatz

Mitosen insgesamt 366 186

---- ZUSATZ *ADRIAMYCIN*

— KONTROLLE

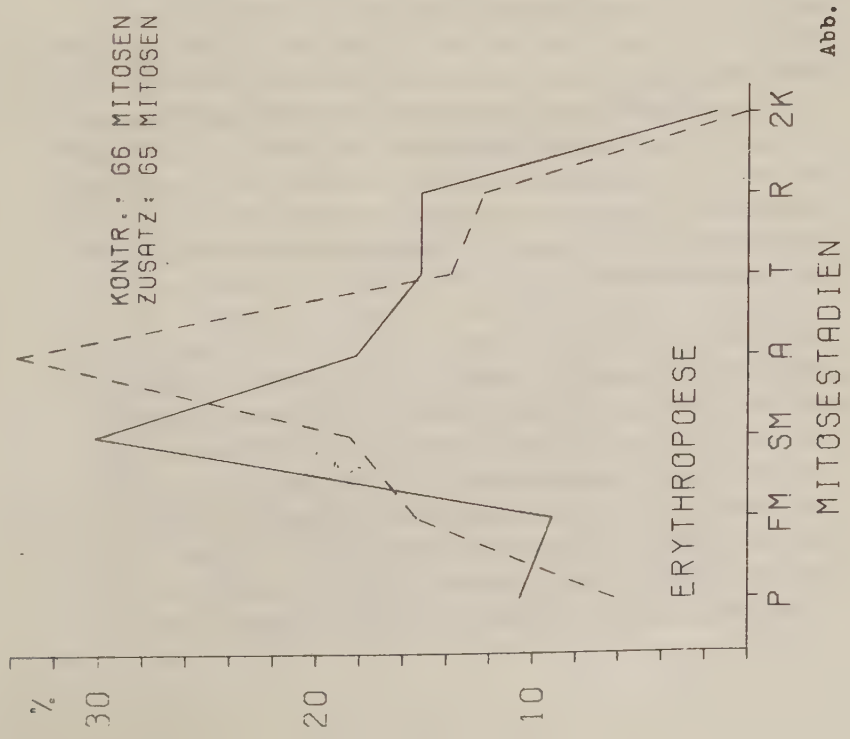
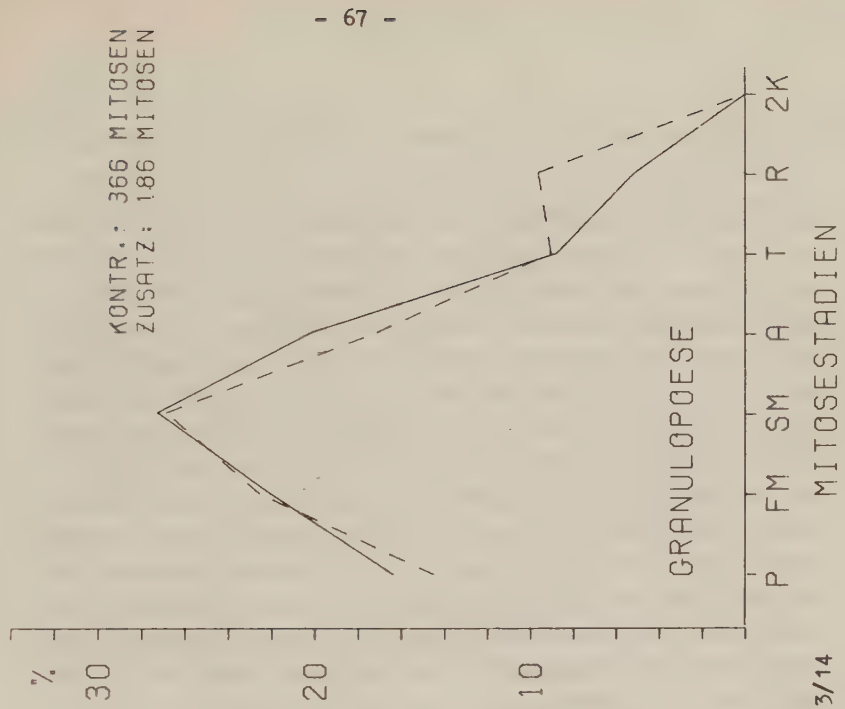


Abb. 13/14



DISKUSSION

Die Überlebenshaltung von Knochenmarkszellen in der Kultur ist für die Mehrzahl der Fragestellungen nur über einen Zeitraum von etwa 3 Tagen relevant, da nicht ausreifende Blutzellvorstufen später entdifferenzieren und fibroblastoid umgewandelt werden (FRIDERICI, cit. nach BOLL und FUCHS (12)). Die in der Coagulumkultur üblicherweise auftretenden Verschiebungen der Zellzusammensetzung wurden von FUCHS mathematisch berechnet; dabei konnten Mitosehäufigkeit und Verweildauer der Zellen in den einzelnen Reifungsstadien bzw. ihre zeitlichen Umwandlungen befriedigend vorausgesagt werden. Für die o.g. Zeitspanne ist demnach eine artifizielle Stimulation der Zellproliferation durch trophische Einflüsse aus dem Kulturmedium mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Somit wird das Verhalten der hämatopoetischen Zellen in vitro wie in vivo durch die natürliche Reifung und Regeneration bestimmt, darüber hinaus in der Kultur auch durch die fehlende Möglichkeit, die reifen Elemente zu eliminieren. Unter dieser Prämisse erscheinen Untersuchungen an menschlichem Knochenmark in vitro, wie sie auch der vorliegenden Arbeit zugrundeliegen, wissenschaftlich einwandfrei legitimiert. Gegenstand der Untersuchungen war die Frage nach den Auswirkungen des Cytostaticums ADRIAMYCIN^R auf leukämisches Knochenmark des Menschen in der Kultur.

Kriterien einer Beurteilung der Zellausreifung sind Reifungskurven und G/E - Indices; Mitoseindices und karyologische Kurven ermöglichen eine Einschätzung der Regeneration. Die Summe aller Parameter ist ein Maßstab für die Proliferationsaktivität der Coagulumkulturen; die Änderungen von Proliferationskinetik und Zellmorphologie nach ADRIAMYCIN wurden durch direkten Vergleich der Zusatzkulturen (ADR - Konzentration 2,0 µg/ml) mit entsprechenden unbeeinflussten Kontrollkulturen ermittelt.

Das für die akuten monozytären wie für die akuten und chronischen myeloischen Leukämien unterschiedliche Reifungs- und Regenerationsverhalten der Knochenmarkszellen erforderte eine nach Leukämieformen getrennte Betrachtung der Resultate.

Bei den akuten monozytären Leukämien wird die Reifung der Erythrozytopoese in der Kultur durch das Cytostaticum kaum beeinflußt; bei akuten wie chronischen myeloischen Leukämien erscheint sie, entgegen anderslautenden Ergebnissen von BOLL (11) an nicht leukämischem Knochenmark, in den Zusatzkulturen mäßig tardiert (Abb. 1..8). Während in sämtlichen Kontrollkulturen die Mitoseindices der roten Zellreihe in den ersten beiden Kulturtagen noch beträchtlich ansteigen und erst am dritten Tag leicht fallende Tendenz zeigen, nehmen sie unter ADRIAMYCIN - Einwirkung erheblich ab (Tab. C, Abb. 10). Da zudem in den karyologischen Kurven eine klare Verschiebung der bevorzugt anzutreffenden Mitosephasen von den späten Meta- zu den Anaphasen zum Ausdruck kommt (Tab. G, Abb. 13), erweist sich in den Zusatzkulturen die Regeneration ebenso wie die Reifung als eingeschränkt; das Cytostatikum bewirkt demnach für die Zellen der Erythrocytopoese bei den myeloischen und monozytären Leukämien eine Verminderung der Proliferationsaktivität.

Von vorrangigem Interesse bei der Betrachtung von leukämischem Knochenmark des Menschen ist selbstverständlich die Myelopoese. Für die akuten monozytären Leukämien weist die Differentialverteilung der Zellen der weißen Reihe den zu erwartenden relativ hohen Anteil an monozytären Elementen aus, während vor allem die reifere Granulozytopoese beträchtlich vermindert ist. Die schon in den Kontrollkulturen geringe Reifungsneigung geht bei den drei untersuchten Knochenmarkproben von AMoL in den Zusatzkulturen am zweiten und dritten Kulturtag in eine eindeutige Reifungsverzögerung über; die teilungsfähigen Zellen der Granulopoese präsentieren sich auch nach

72 Stunden in Kultur nahezu unvermindert (Abb. 1..4). Der G/E - Index, in den unbehandelten Kulturen gegenüber dem Vergleichswert für normales Knochenmark noch beträchtlich erhöht, zeigt - wie auch vergleichbare Studien von BOLL (11) an nicht leukämischem Knochenmark ergeben haben - unter dem Einfluß von ADRIAMYCIN über die gesamte Inkubationsdauer eine deutliche Abnahme (Tab. A, Abb. 9), die nach dem Resultat der Signifikanzberechnung als einwandfrei gesichert gelten kann (Tab. B). Damit sind die durch das Cytostaticum in den Coagulumkulturen der AMoL hervorgerufenen Verschiebungen in der Differentialverteilung der hämatopoetischen Zellen zweifelsfrei im Sinne einer Reifungshemmung zu interpretieren.

Im Gegensatz zu Ergebnissen von BOLL (8.1,8.2) ist bei den akuten monozytären Leukämien bereits in den unbeeinflussten Kulturen ein Ansteigen der Mitoseindices über die gesamte Beobachtungszeit zu verzeichnen; die Wirkung des ADR äußert sich in einer weiteren, allerdings geringfügigen Steigerung der Mitoseraten (Tab. D, Abb. 11). Da ferner die karyologische Kurve für die Zusatzkulturen keine Abweichung der Mitosephasenverteilung ausweist (Tab. H, Abb. 14), muß die in den Kontrollkulturen der AMoL ohnehin angeregte Regeneration der Monopoesis durch das Cytostaticum eine zusätzliche Stimulation erfahren haben.

Demnach zeigen beide für die Proliferationsaktivität der Zellkulturen maßgeblichen Parameter ein zwar definitionsgemäß entgegengesetztes, vom Effekt her aber gleichsinniges Verhalten: Die nach ADRIAMYCIN verstärkte homoplastische Regeneration der Granuloblasten muß bei fehlender Ausreifungsmöglichkeit zu einem erhöhten Anteil unreifer Zellstufen führen. Die Unwirksamkeit von ADR gegenüber monozytären Vorstufen wird auch durch Untersuchungen von BOLL (11) an allerdings nicht leukämisch verändertem

Knochenmark bestätigt; dabei wurde unter der Einwirkung des Cytostaticums sogar noch eine beträchtliche Zunahme der monozytären Elemente gesehen.

Bekanntlich ist bei der akuten Myeloblastenleukämie der normale Zellteilungsmodus der Stammzelle der Myelopoese empfindlich gestört; da mithin die Ausreifung vom Myeloblasten zum Promyelozyten weitgehend blockiert ist, wird bei kaum verminderter Regenerationsaktivität das Knochenmark schließlich mit unreifen Blasten überschwemmt (8.1, 8.2, 10). Der außerordentlich hohe Anteil der Myeloblasten an der Gesamtzahl aller Zellen der weißen Reihe in den beiden für diese Arbeit untersuchten Fällen von AML kann daher ebensowenig überraschen wie die offensichtliche Verdrängung der reiferen Zellstufen der Granulopoese. Die in den unbehandelten Kontrollkulturen nur mäßige Reifungsneigung erfährt unter dem Einfluß von ADRIAMYCIN eine bedeutende Steigerung; die Zahl der Myeloblasten nimmt dabei vornehmlich zu Gunsten der Myelozyten, in geringerem Maße auch der noch reiferen Zellen der Myelopoese stark ab (Abb. 5..7). Wiederum erreicht der G/E - Index in den Kontrollkulturen verhältnismäßig hohe Werte, während er in den Zusatzkulturen mit längerer Kultivierungsdauer merklich abfällt (Tab. A, B; Abb. 9); dennoch ist unter dem Eindruck der erheblich verstärkten Ausreifung in den ADR - versetzten Kulturen eine klare Reifungsförderung zu konstatieren.

Sind die Mitose - Indices schon in den Kontrollkulturen der AML leicht rückläufig, so wurde - wie auch von BOLL (11) für nicht leukämisches Knochenmark beschrieben - nach Anwendung des Cytostaticums ein stetiges, rapides Absinken der Mitoseraten der weißen Zellreihe gesehen (Tab. E, Abb. 12). Diese Werte wurden durch die Signifikanzberechnung auf abweichende Mitosenverteilung in den Kontroll- und Zusatzkulturen - außer für die 3 Tage alte Kultur - zweifelsfrei bestätigt (Tab. F). Bei unveränderter karyologischer Kurve (Tab. H, Abb. 14)

und einem stark herabgesetzten Anteil teilungsfähiger Zellen in den Zusatzkulturen ist dieses Ergebnis Ausdruck einer klaren Beeinträchtigung der Regeneration.

Auch für die Proliferationsaktivität der akuten myeloischen Leukämien kommt somit unter dem Einfluß von ADRIAMYCIN ein Diskrepanzresultat zustande: einer forcierten Zellausreifung steht eine verminderte Regeneration gegenüber; beide Effekte sind jedoch gleichermaßen der angestrebten Wiederherstellung einer normalen Granulozytopoese förderlich.

In der Kontrollkultur der chronischen myeloischen Leukämie erfolgt bei mäßiger Reifungsneigung entsprechend der erhöhten Anzahl der Promyelozyten im Originalpräparat eine Ausreifung bis zum Myelozyten; nach Zusatz des Cytostaticums zum Kulturmedium erscheint die Reifung deutlich tardiert (Abb. 8). Erneut liegt der G/E - Index für die unbeeinflusste Kultur relativ hoch; nach ADR fällt er, wie schon in den Kulturen der AMoL und der AML, beträchtlich ab (Tab. A, B; Abb. 9). Unter Berücksichtigung sämtlicher Faktoren ergibt sich infolgedessen eine eindeutige Reifungshemmung.

Der Mitoseindex zeigt - wie auch bei den AML - bereits in der Kontrollkultur fallende Tendenz; erwartungsgemäß (11) wurde unter ADRIAMYCIN - Einwirkung wiederum eine weitere signifikante Senkung der Mitoseraten der Granulopoese beobachtet (Tab. E, F; Abb. 12). Wie aus der karyologischen Kurve ersichtlich, bleibt dagegen die Mitosephasenverteilung in der Zusatzkultur unverändert (Tab. H, Abb. 14). Somit erweisen sich Reifung und Regeneration als gleichermaßen eingeschränkt; die Proliferationsaktivität in der Coagulumkultur der CML konnte durch das Cytostaticum erheblich verringert werden.

Die vorgelegten Ergebnisse werden insgesamt durch zahl-

reiche klinische Erfahrungsberichte namhafter Autoren gestützt; während nahezu alle diesbezüglichen Veröffentlichungen über Therapieerfolge mit ADRIAMYCIN bei den akuten wie den chronischen myeloischen Leukämien berichten, wurden im gleichen Zusammenhang bei der akuten monozytären Leukämie Remissionen offenbar nur in seltenen Einzelfällen gesehen (4,6,14,15,16,30,32,34,36,37,39,41,43,44,45,46,48,51,52).

Morphologische Veränderungen der Knochenmarkzellen wurden fast ausschließlich in den Zusatzkulturen festgestellt. Neben Megaloblasten und z.T. polyploiden Riesenzellen der Granulopoese konnten dabei auch Zytoplasmavakuolen, Kernabsprengungen und atypische Kernformen sowie Kernvakuolen und aufgelöste Kernmembranen beobachtet werden. Ähnliche Erscheinungen wurden in der Literatur bereits nach wesentlich geringeren ADRIAMYCIN - Konzentrationen als den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten $2,0 \mu\text{g/ml}$ beschrieben (29,42); darüber hinaus sahen MASSIMO (29), STACHER (42) und VIG (47) neben einer Vielzahl verschiedenartiger Formen von Chromosomenaberrationen mit steigender Dosierung des Cytostaticums vermehrt devitale Zellen, deren Deformationen von der Agglutination des Kernchromatins bis zur vollständigen Lysis sämtlicher Zellstrukturen reichten.

Da ADR - wie im Kap. "Einführung" dargelegt - vom menschlichen Körper im Unterschied zu DNR kaum metabolisiert wird (2,18,21) wirkt es auch in vivo unmittelbar auf Tumorgewebe bzw. leukämisches Knochenmark ein. Der nach intravenöser Applikation des Chemotherapeutikums zunächst sehr hohe Blutspiegel ist bereits nach wenigen Minuten weitgehend abgebaut; durch die anschließende kontinuierliche Rückgabe des Cytostatikums aus den Speicherfunktion ausübenden nukleinsäurereichen Geweben von Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere an das Blut stellt sich ein Fließgleichgewicht ein: es kommt zu einem über mehrere

Tage anhaltenden, gleichmäßig niedrigen Blutspiegel (2, 4, 6, 18, 21). Dieser Blutspiegel lag im Tierexperiment an Mäusen mit Sarkom 180 nach i.v. - Einzelinjektionen zwischen 5..8 mg/kg Körpergewicht des Versuchstieres deutlich über 1.5 $\mu\text{g/ml}$ (2, 18). Da für die Humantherapie ähnliche Werte angenommen werden können, scheint eine eindeutige Beziehung zu der in dieser Arbeit zugrundegelegten ADRIAMYCIN- Konzentration von 2.0 $\mu\text{g/ml}$ gegeben.

Im Rahmen der von BOLL initiierten Studienreihe wurden dem Thema der vorliegenden Untersuchung entsprechende Fragestellungen auch für DAUNOMYCIN bearbeitet, und zwar von WELT (54) an nicht leukämischem und von BUCH (53) an leukämischem Knochenmark; die mittlere verwendete Konzentration des Cytostatikums lag dabei mit 1.0 $\mu\text{g/ml}$ - entsprechend der von zahlreichen Autoren (18, 21, 22, 29, 31, 40, 49, 52) an in vitro - Kulturen festgestellten etwa doppelt so hohen Wirksamkeit des DNR gegenüber dem ADR - mit 1.0 $\mu\text{g/ml}$ um die Hälfte niedriger als in dieser Arbeit (s. auch Kap. "Einführung").

Übereinstimmend wird von WELT (54) für nicht leukämisches bzw. von BUCH (53) für leukämisches Knochenmark nach DAUNOMYCIN eine Reifungsförderung bei gleichzeitiger Beeinträchtigung der Regeneration festgestellt. - Unter dem Einfluß von ADRIAMYCIN fand BOLL (11) in nicht leukämischen Knochenmarkkulturen eine deutlich verminderte Regenerationsaktivität. Dieser Befund entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation in bezug auf die akuten und chronischen myeloischen Leukämien; die eher gesteigerte Regenerationsaktivität der Monopoese bei den AMoL findet ihr Äquivalent in den von BOLL (11) wiederholt beobachteten Steigerungen der Zahl der monozytären auf Kosten der myelozytären Elemente durch ADR.

ZUSAMMENFASSUNG

Unter Ausschaltung pharmakokinetischer Verteilungsphänomene und natürlicher Regulationsmechanismen - wie sie im Tierversuch und auch bei der klinischen Erprobung von Chemotherapeutika einen gewichtigen Störfaktor darstellen - wurde in der vorliegenden Arbeit die unmittelbare Wirkung des Cytostaticums ADRIAMYCIN^R auf leukämisches Knochenmark in vitro untersucht.

Nach der von BOLL (12) modifizierten CARELL'schen Deckglasmethode wurden von 5 Patienten mit unterschiedlichen Formen der Leukämie 6 Kulturen mit einem ADRIAMYCIN - Zusatz von 2,0 µg/ml sowie - parallel dazu - eine entsprechende Anzahl von unbehandelten Kontrollkulturen angelegt. Reifungskurven und G/E - Indices als Kriterien für die Beurteilung der Reifung, Mitoseindices und karyologische Kurven als Maßstab für die Einschätzung der Regeneration wurden aus Differentialzählungen nach 0, 24, 48 und 72 Stunden in Kultur ermittelt und die Werte der jeweiligen Kontroll- und Zusatzkulturen miteinander verglichen.

Während das Cytostaticum für die akuten monozytären Leukämien bei verringerter Ausreifung zu einer eher noch verstärkten Regeneration der Granuloblasten führte, rief es dagegen in den Kulturen der AML und der CML den gewünschten Effekt einer Verringerung der Proliferationsaktivität der leukämischen Blasten hervor.

Morphologische Veränderungen der Knochenmarkszellen traten überwiegend in den Zusatzkulturen auf; neben Megaloblasten und mehrkernigen Riesenzellen der Granulopoese wurden vor allem Cytoplasma- und Kernvakuolen sowie Kernabsprengungen und zerstörte Kernmembranen gesehen.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) ARCAMONE F., CASSINELLI G., FRANCESCHI G., PENCO S.,
POL C., REDAELLI S., SELVA A.:
Structure and physicochemical properties of Adriamycin (Doxorubicin)
International Symposium on Adriamycin, Milan, Sept.
9th - 10th 1971
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1972)
pag. 9-22
- (2) ARENA E., D'ALESSANDRO N., DUSONCHET L., GEBBIA N.,
SANGUEDOLCE R., RAUSA L.:
Influence of pharmacokinetic variations on the pharmacological properties of Adriamycin
International Symposium on Adriamycin, Milan, Sept.
9th - 10th 1971
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1972)
pag. 96-116
- (3) ASTALDI jr. A., CURTONI E., UGAZIO A., MINGRAT G.:
Comparison of the Adriamycin and L-Asparaginase effects on human lymphocytes in cell culture
Blut XXIII: 367-372 (1971)
- (4) BENJAMIN R.S., WIERNIK P.H., BACHUR N.R.:
Adriamycin chemotherapy - Efficacy, safety, and pharmacologic bases of an intermittent single high-dosage schedule
Cancer, 33, n. 1: 19-27 (1974)
- (5) BERTAZZOLI C., CHIELI T., GRANDI M., RICEVUTI G.:
Adriamycin: Toxicity data
Experientia, 26, n. 4: 389-390 (1970)
- (6) BLUM R.H., CARTER S.K.:
Adriamycin - A new anticancer drug with significant clinical activity
Ann. Int. Med. 80, n. 2: 249-259 (1974)
- (7) BOLL I.:
Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkszellen in vitro - Granuloblastenmitosen
Folia haemat., 3, n. 1: 57-77 (1958)
- (8.1) BOLL I., MERSCH G.:
Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulozytopoese in vitro
Blut XIX: 257-274 (1969)

- (8.2) BOLL I.:
Die Proliferationskinetik der normalen und leukämischen Granulozytopoese
Folia haemat., 91, n. 2/3: 172-191 (1969)
- (9) BOLL I., MERSCH G.:
Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro
Blut XVII: 193-214 (1968)
- (10) BOLL I.:
Einführung in den Gesprächskreis "Proliferationskinetik der Leukämien"
Sonderdruck aus "Leukämie", 11: 161-164
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1972)
- (11) BOLL I.:
Effect of Adriamycin on the cell kinetic of human bone marrow in vitro
International Symposium on Adriamycin, Milan, Sept. 9th - 10th 1971
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1972)
pag. 23-25
- (12) BOLL I., FUCHS G.:
Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro
Blut VII, n.5: 257-272 (1961)
- (13) BOLL I.:
Leitfaden der cytologischen Knochenmark-Diagnostik
Sonderbände zu "Blut", Bd. 11
J.F. Lehmanns Verlag München (1973)
- (14) BONADONNA G., MONFARDINI S., DE LENA M., FOSSATI-BELLANI F.:
Clinical evaluation of Adriamycin, a new antitumor antibiotic
Brit. Med. J., 3: 503-506 (1969)
- (15) BONADONNA G., MONFARDINI S., DE LENA M., FOSSATI-BELLANI F., BERETTA G.:
Phase I and preliminary phase II evaluation of Adriamycin (NSC 123127)
Cancer Res., 30, n. 10: 2572-2582 (1970)

- (16) BONADONNA G., MONFARDINI S., DE LENA M., FOSSATI-BELLANI F., BERETTA G.:
Clinical trials with Adriamycin. Results of three - years study
International Symposium on Adriamycin, Milan, Sept. 9th - 10th 1971
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1972)
pag. 139-152
- (17) BONADONNA G., BRAMBILLA C., BAJETTA E., TANCINI G., GASPARINI M., FOSSATI F., DE PALO G.M.:
Adriamycin used in combination with conventional agents in the treatment of solid tumors
Com.: Adriamycin Symp. Frankfurt/M., 18. Mai 1974
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1975)
pag. 127-143
- (18) DI MARCO A.:
Adriamycin: the therapeutic activity on experimental tumors
International Symposium on Adriamycin, Milan, Sept. 9th - 10th 1971
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1972)
pag. 53-63
- (19) DI MARCO A., GAETANI M., SCARPINATO B.:
Adriamycin (NSC 123127): a new antibiotic with antitumor activity
Cancer Chemother. Rep. (part 1), 53, n. 1: 33-37
(1969)
- (20) FREI E., LUCE J.K., MIDDLEMAN E.:
Clinical trials of Adriamycin
International Symposium on Adriamycin, Milan, Sept. 9th - 10th 1971
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1972)
pag. 153-160
- (21) GHIONE M.:
Adriamycin - Biochemische Aspekte
2. Internationale Arbeitstagung über Chemo- und Immunotherapie der Leukosen und malignen Lymphome,
Wien, 20. - 23. März 1972
- (22) GHIONE M., KARIM O.:
Antibakterielle Therapie und Immunsuppression
Ars Medici, 27, n. 11: 1838-1844 (1972)

- (23) GÖHDE W., SCHUMANN J., BÜCHNER Th., BARLOGIE B.:
Synchronisierung von Tumorzellen durch Adriamycin -
Möglichkeiten der Kombinationstherapie
Com.: Adriamycin Symp. Frankfurt/M., 18. Mai 1974
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1975)
pag. 14-23
- (24) GOLDIN A., JOHNSON R.K.:
Adriamycin activity in experimental tumors
Com.: Adriamycin Symp., Frankfurt/M., 18. Mai 1974
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1975)
pag. 3-13
- (25) GOTTLIEB J.A.:
Adriamycin: Activity in solid tumors
Com.: Adriamycin Symp., Frankfurt/M., 18. Mai 1974
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1975)
pag. 95-102
- (26) HOSHINO A., KATO T., AMO H., OTA K.:
Antitumor effects of Adriamycin on Yoshida rat sarcoma and L 1210 mouse leukemia - cross resistance and combination chemotherapy
International Symposium on Adriamycin, Milan, Sept. 9th - 10th 1971
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1972)
pag. 75-89
- (27) ISETTA A.M., INTINI C., SOLDATI M.:
On the immunodepressive action of Adriamycin
Experientia, 27: 202-204 (1971)
- (28) JUNGI W.F., MAYR A.C., SMITH P., NAGEL G.A., SENN H.J.:
Erste Erfahrungen mit Adriamycin, einem neuen cytotoxischen Antibiotikum in der Kombinationschemotherapie maligner Tumore
Schweiz. Med. Wschr., 102, n. 34: 1213-1221 (1972)
- (29) MASSIMO L., DAGNA-BRICARELLI F., CHERCHI M.G.:
Effects of Adriamycin on blastogenesis and chromosomes of blood lymphocytes: "in vitro" and "in vivo" studies
International Symposium on Adriamycin, Milan, Sept. 9th - 10th 1971
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1972)
pag. 35-46

- (30) MATHE G., AMIEL J.L., Hayat M., DE VASSAL F., SCHWARZENBERG L., SCHNEIDER M., JASMIN Cl., ROSENFELD Cl.:
Adriamycin in the treatment of acute leukemias
International Symposium on Adriamycin, Milan, Sept.
9th - 10th 1971
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1972)
pag. 168-172
- (31) MERIWETHER W.D., BACHUR N.R.:
Inhibition of DNA and RNA metabolism by Daunorubicin
and Adriamycin in L 1210 mouse leukemia
Cancer Res., 32: 1137-1142 (1972)
- (32) MONFARDINI S., BONADONNA G., DI PIETRO S., GUINDANI A., FOSSATI-BELLANI F., DE LENA M.:
Sperimentazione clinica preliminare con Adriamicina
in pazienti affetti da leucemia e tumori solidi in
fase avanzata
Tumori, 55, n. 4: 197-216 (1969)
- (33) NAGEL G.A.:
Tumorthérapie mit Adriamycin in hohen Dosen
Com.: Adriamycin Symp., Frankfurt/M., 18.Mai 1974
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1975)
pag. 119-123
- (34) OBRECHT P., WESTERHAUSEN M., SIMON A.:
Erste Ergebnisse der klinischen Prüfung von Adriamycin
Dtsch. Med. Wschr., 96, n. 9: 369-376 (1971)
- (35) OSSWALD H.:
Potenzierung der chemotherapeutischen Wirkung von
Adriamycin durch bestimmte Nukleoside
Com.: Adriamycin Symp., Frankfurt/M., 18.Mai 1974
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1975)
pag. 24-31
- (36) PAULISCH R., SCHNEIDER D., ANAGNOU J., KOEPPEN K.-M.,
GERHARTZ H.:
Zur Adriamycin-Behandlung akuter Erwachsenen-Leukämien
Com.: Adriamycin Symp., Frankfurt/M., 18.Mai 1974
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1975)
pag. 87-92
- (37) RASTETTER J.:
Adriamycin bei der Therapie der Erwachsenenleukämie
Com.: Adriamycin Symp., Frankfurt/M., 18.Mai 1974
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1975)
pag. 83-86

- (38) SANDBERG J.S., HOWSDEN F.L., DI MARCO A., GOLDIN A.:
Comparison of the antileukemic effect in mice of
Adriamycin (NSC 123127) with Daunomycin (NSC 82151)
Cancer Chemother. Rep. (part 1), 54, n. 1: 1-7
(1970)
- (39) SCHWARZENBERG, L., MISSET J.L., POUILLART P., AMI-
EL J.L., MATHE G.:
Adriamycin in the treatment of acute leukemias and
non-hodgkin lymphomas
Com.: Adriamycin Symp., Frankfurt/M., 18. Mai 1974
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1975)
pag. 53-58
- (40) SILVESTRINI R., GAMBARUCCI C., DASDIA T.:
Attività biologica dell' Adriamicina "in vitro"
Tumori, 56, n. 3: 137-148
(1970)
- (41) SINKS L.F., CORTES E., WANG J.J., HOLLAND J.F.:
The effect of Adriamycin on solid tumors and acute
leukemia of adults and children
International Symposium on Adriamycin, Milan, Sept.
9th - 10th 1971
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1972)
pag. 195-203
- (42) STACHER A., LUTZ D.:
In-vitro-Untersuchungen zur immunsuppressiven Wir-
kung von Bleomycin und Adriamycin
Wiener klin. Wschr., 86, n. 5: 124-127
(1974)
- (43) STACHER A., BÖHNEL J., HÖCKER P.:
Zur Wirkung von Daunomycin und Adriamycin im Rahmen
der cytostatischen Kombinationstherapie akuter Leu-
kosen Erwachsener
Med.Klin., 67, n. 31: 1018-1023
(1972)
- (44) TAN C., ETCUBANAS E., WOLLNER N., ROSEN G., GILLA-
DOGA A., SHOWEL J., MURPHY M.L., KRAKOFF I.H.:
Adriamycin - an antitumor antibiotic in the treat-
ment of neoplastic diseases
Cancer, 32, n. 1: 9-17
(1973)
- (45) TAN C., ETCUBANAS E., WOLLNER N., ROSEN G., MUR-
PHY M.L., KRAKOFF I.H.:
Adriamycin in children with acute leukemia and other
neoplastic diseases
International Symposium on Adriamycin, Milan, Sept.
9th - 10th 1971
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1972)
pag. 204-212

- (46) TAN C., GILLADOGA A., GHAVIMI F., ROSEN G., HAGH-BIN M., WOLLNER N., HELSON L., MURPHY M.L.:
Adriamycin alone and in combination in the treatment of childhood neoplastic diseases
Com.: Adriamycin Symp., Frankfurt/M., 18.Mai 1974
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1975)
pag. 71-82
- (47) VIG B.K.:
Chromosome aberrations induced in human leukocytes by the antileukemic antibiotic Adriamycin
Cancer Res., 31: 32-38 (1971)
- (48) WANG J.J., CORTES E., SINKS L.F., HOLLAND J.F.:
Therapeutic effect and toxicity of Adriamycin in patients with neoplastic disease
Cancer, 28, n. 4: 837-843 (1971)
- (49) WANG J.J., CHERVINSKI D.S., ROSEN J.M.:
Comparative biochemical studies of Adriamycin and Daunomycin in leukemic cells
Cancer Res., 32: 511-515 (1972)
- (50) WHEATLEY D.N.:
Action of Adriamycin in HeLa cells. Evidence of a G_2 inhibition
International Symposium on Adriamycin, Milan, Sept. 9th - 10th 1971
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1972)
pag. 47-52
- (51) WHITEHOUSE J.M.A., CROWTHER D., MALPAS J.S.:
Adriamycin in the treatment of acute leukemia
International Symposium on Adriamycin, Milan, Sept. 9th - 10th 1971
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1972)
pag. 213-216
- (52) WILLMANN W., WILMS K.:
Adriamycin bei der Behandlung akuter Leukämien.
Biochemische Grundlagen und klinische Ergebnisse
Com.: Adriamycin Symp., Frankfurt/M. 18.Mai 1974
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1975)
pag. 59-70

Dissertationen

(53) BUCH K.:

Die Wirkung von Daunomycin auf die Proliferation
von menschlichem leukämischem Knochenmark in vitro
(Berlin 1975)

(54) WELT W.:

Die Einwirkung von Daunomycin auf menschliches
Knochenmark in vitro (Berlin 1973)

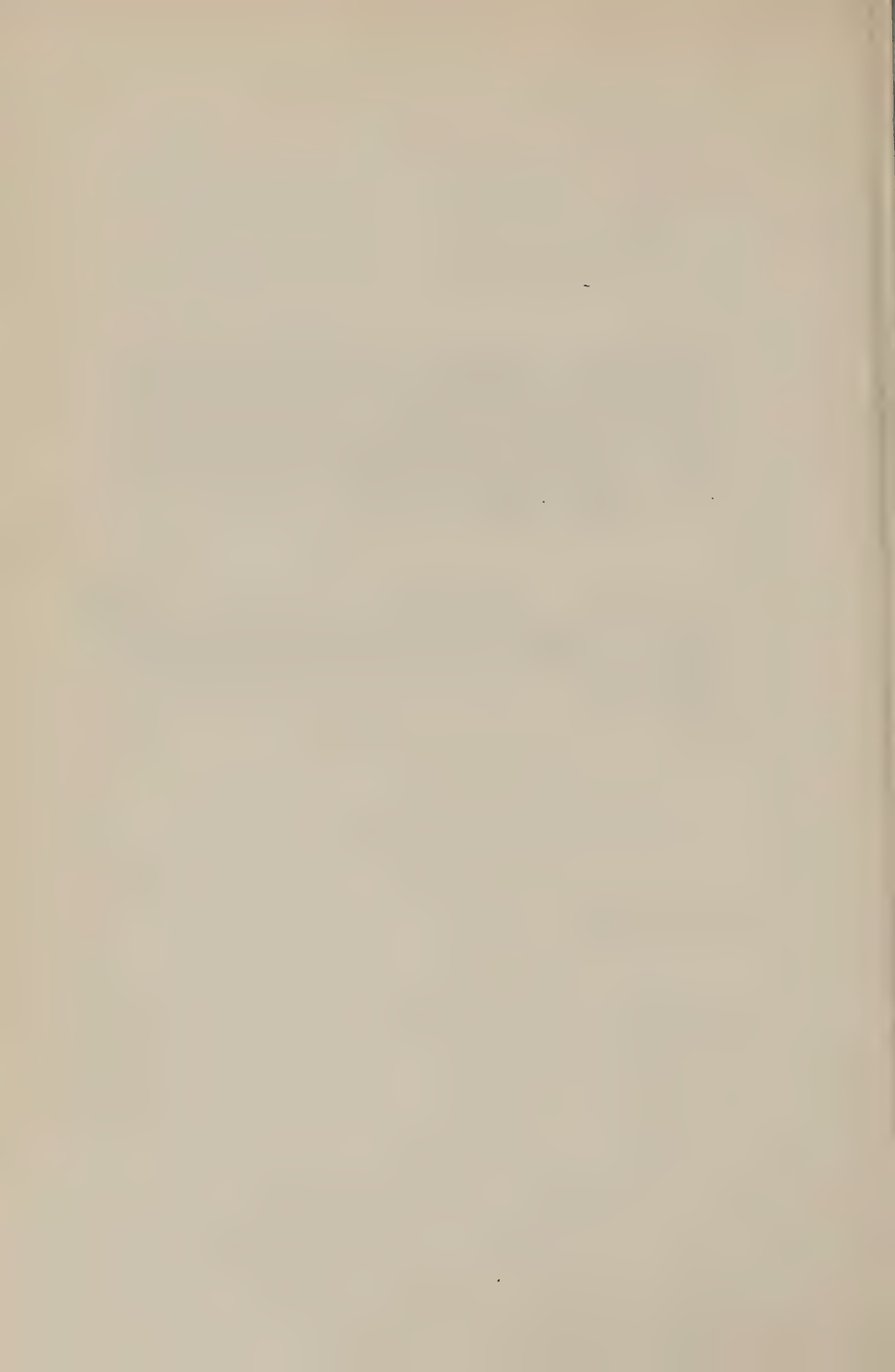
Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie
EURATOM - GSF, Nr. 031-64-1 BIAD.

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsge-
meinschaft unterstützt.



Frau Professor Dr. med. Irene Boll danke ich ganz besonders für das Überlassen des Dissertationsthemas, für ihre freundliche Hilfestellung bei der Einarbeitung sowie die wertvolle fachliche Beratung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Meinem Vater, Herrn Versuchs-Ing. Siegfried Sorber, sage ich herzlichen Dank für die wirkungsvolle Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.



LEBENS LAUF

Am 05.06.1948 wurde ich in Wolfsburg geboren. Nach vierjähriger Grundschulzeit besuchte ich von 1958 bis zum Abitur 1968 das Theodor Heuß - Gymnasium in Wolfsburg.

Die Zulassung zum Studium der Zahnmedizin an der Freien Universität Berlin erfolgte zum Sommersemester 1969; dort bestand ich am 20.03.1970 die naturwissenschaftliche und am 11.10.1971 die zahnärztliche Vorprüfung und schloß am 16.07.1974 mein Studium mit dem zahnärztlichen Staatsexamen ab.

Zum 01.09.1975 bin ich als Offizier auf Zeit (Zahnarzt) in den Sanitätsdienst der Bundeswehr eingetreten.

